

Proteinchemische und kinetische Untersuchungen am Papain

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Hans-Gerhard Löffler
aus Stuttgart

Marburg/Lahn 1974

Proteinchemische und kinetische Untersuchungen am Papain

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



von
Hans-Gerhard Löffler
aus Stuttgart

Marburg/Lahn 1974



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/L als Dissertation angenommen am 10.6.1974

Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.1974

Dekan:	Prof. Dr. H. Klamberg
Berichterstatter:	Prof. Dr. Fr. Schneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Follmann

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter
der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider

im Physiologisch-chemischen Institut II der Philipps-
Universität Marburg angefertigt.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider, danke
ich für die stete Förderung der vorliegenden Unter-
suchungen und für viele anregende Diskussionen.

Für vorzügliche technische Assistenz danke ich
Fräulein G. Schmitt und Frau P. Brunet.

Frau R. Sauer danke ich für die Anfertigung der
Zeichnungen.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Material und Methoden	
2.1. Geräte	8
2.2. Chemikalien	10
2.3. Enzym	13
2.4. Analytische Methoden	
2.4.1. Proteinbestimmung	14
2.4.2. Diskelektrophorese	16
2.4.3. CD-Messungen	17
2.4.4. Aminosäureanalyse	17
2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten	20
2.6. Chemische Modifizierung des Enzyms	23
2.6.1. Vorbereitung des Enzyms	23
2.6.2. Succinylierung	24
2.6.3. Acetylierung mit N-Acetyl-Imidazol	25
2.6.4. Reaktion der Tryptophanreste mit Koshland's Reagenz	26
2.6.5. N-Brom-Succinimid-Oxidation	27
2.6.6. Nitrierung des Enzyms mit Tetranitromethan	28
2.6.7. Modifizierung der Carboxylgruppen	29
2.6.8. Modifizierung mit 5-Diazo-1H-tetrazol	32
3. Ergebnisse	
3.1. Reversible Blockierung der essentiellen SH-Gruppe	36
3.2. Succinylierung der Lysinreste	
3.2.1. Kinetik der Succinylierung	37
3.2.2. Eigenschaften des Succinylpapains	38
3.2.3. Vergleichende kinetische Untersuchungen am Papain und Succinylpapain mit niedermolekularen und hochmolekularen Substraten	40

3.3.	Acetylierung der Tyrosinreste	47
3.4.	Reaktion der Tryptophanreste mit Kosh- land's Reagenz	49
3.5.	Modifizierung der Carboxylgruppen des Enzyms	53
3.6.	Reaktion des Enzyms mit 5-Diazo-1H-tetra- zol	59
3.7.	Modifizierung des Enzyms mit Tetranitro- methan	70
3.8.	Oxidation der Tryptophanreste mit N-Brom- succinimid	75
4.	Diskussion	
4.1.	Methodik	79
4.2.	Funktion und Zustand der Aminosäuren	
4.2.1.	Reaktivität und Zustand der Lysinreste	86
4.2.2.	Papain- und Succinylpapain-katalysierte Hydrolyse von Proteinsubstraten	88
4.2.3.	Funktion und Zustand des Histidins	93
4.2.4.	Reaktionen des Tyrosins	95
4.2.5.	Die Rolle des Tryptophans	101
4.2.6.	Bedeutung der Carboxylgruppen für die katalytische Aktivität	106
4.3.	Zusammenfassung und Deutung der für das aktive Zentrum relevanten Befunde. Vor- schlag für den Mechanismus der Papain- Katalyse	107
5.	Zusammenfassung	112
6.	Literaturverzeichnis	116

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BAEE	N ^α -Benzoyl-L-arginin-äthylester
BAPA	N ^α -Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid
CMC	N-Cyclohexyl-N-(β-[N'-methylmorpholino]-äthyl) carbodiimid-p-toluolsulfonat
DHT	5-Diazo-1H-tetrazol
EDC	N-Äthyl-N'-(3-dimethylamino)-propyl-carbodiimid hydrochlorid
GDH	Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2)
GEE	Glycin-äthylester
HNDB	2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid
MES	N-Morpholino-2-äthansulfonsäure
MOPS	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (red.)
NBS	N-Brom-succinimid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNM	Tetranitromethan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Papain, ein proteolytisches Enzym, wurde bereits vor 20 Jahren von KIMMEL und SMITH [1] aus Papaya-Latex isoliert und kristallisiert. Da es ein sehr stabiles Enzym ist und in beliebiger Menge zur Verfügung steht, wurde eine große Anzahl kinetischer und proteinchemischer Untersuchungen an diesem Enzym durchgeführt [2, 3, 4, 5, 6, 7]; die Aminosäuresequenz ist bekannt [8, 9] und eine Röntgenstrukturanalyse bei 2 Å-Auflösung liegt vor [10, 11, 12].

Trotz einer eindrucksvollen Fülle von experimentellen Daten, konnte nicht nur der Mechanismus der durch Papain katalysierten Reaktion bis heute nicht geklärt werden, sondern es blieben auch andere Fragen, wie z.B. die Bedeutung bestimmter Aminosäuren, vor allem des Tryptophans und Tyrosins für die Erhaltung der aktiven Konformation des Enzyms oder die Struktur des nicht aktivierbaren Anteils [13, 14] bisher unbeantwortet.

Schon frühzeitig wurde erkannt [15], daß Papain eine Sulfhydryl-Protease ist, deren SH-Gruppe für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Bei der normalen Aufarbeitung [16] ist der größte Teil der Enzymmoleküle inaktiv, da ihre SH-Gruppen blockiert sind; zum Teil durch Bildung eines gemischten Disulfids mit Cystein [17]. Das Disulfid kann durch einen Überschuß an Cystein reduziert werden, der freie SH-Gehalt erreicht aber nie 100 %, so daß man zwischen Papainmolekülen mit einer reversibel und

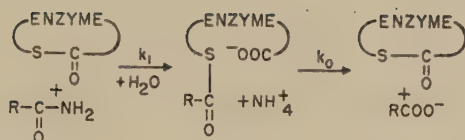
irreversibel blockierten SH-Gruppe unterscheiden muß.

Die chemische Natur der irreversiblen Blockierung ist noch nicht bekannt [13].

Da die nukleophile Reaktivität der essentiellen SH-Gruppe des Enzyms, gemessen an der Geschwindigkeit der Umsetzung mit elektrophilen Reagenzien, um mehr als zwei Zehnerpotenzen höher liegt als in einfachenniedermolekularen SH-Verbindungen [18, 19, 20, 21], stellt sich die Frage, wie diese extreme Erhöhung der Reaktivität zustandekommt. Ist sie zum Beispiel eine Folge einer speziellen Mikroumgebung oder der Kooperation der SH-Gruppe mit anderen in unmittelbarer Nähe befindlichen funktionellen Gruppen.

Proteinchemische, kinetische und Modellstudien haben in den letzten 20 Jahren zu verschiedenen Formulierungen des Mechanismus der Enzymkatalyse geführt [4, 13, 22, 23, 24], deren gemeinsames Merkmal die zentrale Rolle einer SH-Gruppe ist.

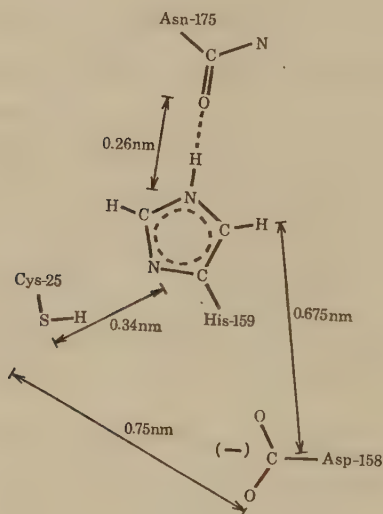
Der erste Vorschlag eines Mechanismus der Papainkatalyse stammt von SMITH [23]. SMITH nahm an, daß das aktive Zentrum einen intra-Thiolester enthält und der erste Schritt der Amid- und Esterspaltung in einer Art Trans-esterifizierungsreaktion besteht, bei der ein Acylenzym als transitorisches Intermediat bei gleichzeitiger Freisetzung der Carboxylgruppe gebildet wird; der Deacylierungsschritt ist Carboxylat-katalysiert.



Die hauptsächlichsten experimentellen Stützen für diesen Mechanismus waren kinetische Daten, vor allem der Einfluß des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Dielektrizitätskonstanten und von D_2O auf k_1 und k_0 . Obwohl neuere Erkenntnisse diesen Mechanismus ausschließen, waren zwei wesentliche Merkmale der Papain-Katalyse, nämlich die Bildung eines Acylenzymsin Form eines Thiolesters und die Bedeutung einer Carboxylgruppe, richtig erkannt und vor allem durch mehrere neuere Untersuchungen einschließlich der Befunde der vorliegenden Arbeit zu bestätigen.

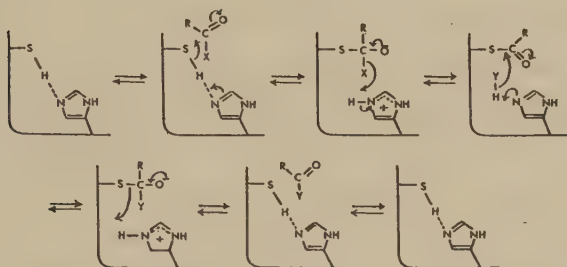
Thermodynamische Überlegungen und Modelluntersuchungen, zusammen mit neueren Ergebnissen einer vertieften kinetischen Analyse der Enzymreaktion, haben das Konzept des intramolekularen Thiolesters in Frage gestellt. Es wurde verdrängt durch das Konzept einer kooperativen Imidazol-SH-Katalyse, das durch Experimente von LOWE, WILLIAMS et al. [25, 26, 27, 28, 29], die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse [10] und Modellstudien [26] besonders überzeugend gestützt schien. HUSAIN und LOWE [27] konnten durch ein Vernetzungsexperiment mit 1,3-Dibromaceton die

enge räumliche Nachbarschaft eines Imidazolrestes und einer SH-Gruppe demonstrieren. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte, daß Histidin-159 und Cystein-25 sich im Abstand von 0,34 nm befinden, in größerem Abstand von 0,75 nm zum Cystein und 0,675 nm zum Histidin eine Carboxylgruppe von Asparaginsäure-158 lokalisiert ist [13].



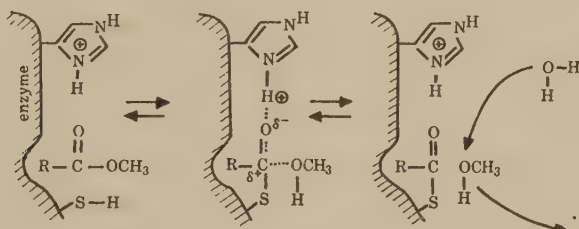
Diese Erkenntnisse führten, unterstützt durch Modellreaktionen, in denen die Aktivierung einer SH-Gruppe durch einen ideal benachbarten Imidazolrest demonstriert werden konnte, zur Formulierung von zwei Mechanismen, von denen der von LOWE [24] sich an den Chymotrypsinmechanismus anlehnt und eine Aktivierung der SH-Gruppe über eine

Wasserstoffbrücke zum Imidazol postuliert, während DRENTH



Mechanismus der Papain-Katalyse von LOWE [24]

und Mitarbeiter auf diese Wasserstoffbrücke verzichten und dem Imidazoliumion die Aufgabe der Polarisierung der Carbonylgruppe des Substrates übertragen.



Mechanismus der Papain-Katalyse von DRENTH [13]

Obwohl dieses Imidazol-SH-Konzept zunächst große Zustimmung fand, waren einige kritische Punkte von Anfang an nicht zu übersehen. Das betraf vor allem den pK-Wert des beteiligten

Imidazols, der in dem Mechanismus von DRENTH [13] einen Wert von mindestens 9,5 - 10 besitzen muß, in dem Mechanismus von LOWE [24], einen Wert von 4,0.

Beide Werte weichen sehr erheblich von dem bekannten pK-Bereich des Imidazols in Proteinen ab. Außerdem ist bei LOWE die Bildung einer H-Brücke unter der Beteiligung einer SH-Gruppe ein sehr kritischer Punkt. Das Studium des Papains und seines Mechanismus ist also keineswegs abgeschlossen und intensive Bemühungen um die Klärung der ungelösten Probleme sind in verschiedenen Laboratorien im Gange.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen über Funktion und Zustand der Aminosäuren Lysin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin und der freien Carboxylgruppen des Papains. Dabei wird der Einfluß der chemischen Modifizierungen dieser Gruppen auf die Struktur des Proteins, seine physikalisch-chemischen Eigenschaften, katalytische Aktivität und kinetischen Parametern zum Modifizierungsgrad in Beziehung gesetzt. Die katalytische Aktivität der modifizierten Papaine wurde mit niedermolekularen und hochmolekularen Substraten getestet und dadurch Informationen über die Rolle der untersuchten Aminosäuren bei der Wechselwirkung des Enzyms mit Proteinsubstraten wie Dimethyl-Casein, Protamin, Gliadin und Dimethylgelatine erhalten. Für Modifizierungsexperimente am Papain erweisen sich zwei Faktoren als besonders ungünstig: erstens die schlechte Löslichkeit des Enzyms und zweitens das Vorhandensein einer essentiellen SH-Gruppe, die als reaktivste Gruppe

mit praktisch allen Modifizierungsreagenzien reagiert und daher reversibel geschützt werden muß, wofür verschiedene Möglichkeiten bestehen. Die Löslichkeitsschwierigkeiten ließen sich durch Succinylierung des Proteins überwinden; Succinylpapain besitzt eine fast zehnmal größere Löslichkeit als Papain.

Die hier vorgelegten Untersuchungen führten zu neueren Erkenntnissen über die Funktion des Tryptophans, Histidins und der Carboxylgruppen im Papain, insbesondere einer Revision der bisherigen Anschauungen über den Mechanismus des Enzyms, vor allem die Beteiligung des Histidins und der Carboxylgruppen an der Katalyse.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Spektralphotometer

- a) selbstregistrierend, für Kinetik und Spektren:
Beckmann Acta III, mit automatischem Probenwechsler und 2-Wellenlängen-Automatik.
- b) für Absorptionsmessungen: Zeiss PMQ II, mit Discolumeter - Zusatz, T/E-Wandler und Linienkompensations-schreiber METRAWATT RE 511

pH-Meter

RADIOMETER PHM 26 oder PHM 28 mit verschiedenen Einstab- und Zweistabmessketten der Firmen RADIOMETER, INGOLD und METROHM.

pH-Stat-Anordnung

Bestehend aus pH-Meter PHM 26, dem Titrator TTT 11, der Motorbürette ABU 11 und dem Schreiber (Titrigraphen) SBR 2 c der Firma RADIOMETER, Kopenhagen. Im temperierbaren Elektrodengefäß mit 1 ml Inhalt wurde entweder die Einstabmeßkette METROHM EA 147 U oder eine RADIOMETER Mikro-Zweistab-Meßkette, bestehend aus der Glaselektrode G 2222 C und der Kalomelelektrode K 4112 verwendet.

Zur direkten Registrierung der Geschwindigkeit der pH-Änderung wurde an dem mV-Ausgang des PHM 26 der Kompensationsschreiber METRAWATT RE 511 angeschlossen. Die Zwischenschaltung eines Gegenspannungsgerätes erlaubte

eine fast rauschfreie Registrierung kleinster Potentialänderungen bei höchster Schreiberempfindlichkeit.

Thermostate

MWG LAUDA WB 2o S 8. oder

MWG LAUDA K 2 RD (Thermostat/Kryostat)

Diskelektrophorese

Analytische Diskelektrophoresen wurden mit einer von BLOEMENDAHL [3o] beschriebenen Apparatur durchgeführt.

Aminosäureanalysator*)

Zur Verfügung stand ein "Unichrom" älterer Bauart der Firma BECKMAN Instruments, München.

Spektropolarimeter**)

JASCO Modell J-2o der Firma JAPAN SPECTROSCOPIC CO. LTD.

Flüssigkeitsszintillationszähler

Packard Tri Carb Modell 3oo3

*) Zu Dank verpflichtet bin ich dem Physiol.-chem. Institut, Lehrstuhl I (Direktor Prof. Dr. Karlson), für die Überlassung des Gerätes, den Herren Dr. Zilg und Prof. Schwick von den Behringwerken, Marburg, für eine Reihe nützlicher Zubehöreile und dem Arbeitskreis Prof. Pfeil vom chemischen Institut für ein Ionenaustauscherharz (BECKMAN M 72).

**) Frau Dr. Ch. Ebert vom Institut für Hochpolymere, Abteilung Biopolymere (Prof. Dr. G. Ebert), danke ich für die Möglichkeit zu CD-Messungen und für Ratschläge bei der Aminosäureanalyse.

Durchflußphotometer

Uvicord II der Firma LKB zur Messung bei 280 nm mit
Schreiber METRAWATT RE 511 (Zwischenschaltung eines
Gegenspannungsgerätes zur Nullpunktunterdrückung).

2.2. Chemikalien

2.2.1. Papain-Substrate

niedermolekulare Substrate

N^α-Benzoyl-L-arginin-äthylester (L-BAEE) MERCK, Darmstadt
für biochemische Zwecke

N^α-Benzoyl-D,L-arginin-äthylester (DL-BAEE) Synthese nach
l.c. [31] Ver-
esterung nach
der Thionylchlorid-
methode.

D,L-Arginin FLUKA, Buchs

N^α-Benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid MERCK, Darmstadt
für biochemische Zwecke (BAPA)

N^α-Benzoyl-L-arginin-amid (BAA) "
für biochemische Zwecke

Benzoyl-Glycin-äthylester und -methylester Synthesen nach
l.c. [32]

Benzoyl-Glycin-4-nitro-anilid Synthese nach
l.c. [33]

hochmolekulare Substrate

Casein, vitaminfrei, reinst SERVA, Heidelberg

Protaminsulfat, rein "

Gelatine für die Bakteriologie MERCK, Darmstadt

Gliadin, rein FLUKA, Buchs

Bemerkungen: Casein wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das in Wasser praktisch unlösliche Gliadin wurde ausgiebig gegen 50 % Äthanol dialysiert. Protaminsulfat (über 80 % Arg - Reste) wurde über eine Anionenaustauschersäule (DOWEX 2 x 10, 200 - 400 mesh) in die freie Basenform überführt und lyophilisiert.

Die Darstellung von N,N'-Dimethylproteinen erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von LIN et al. [34].

Die Aminogruppen der Proteine werden dabei durch reduktive Methylierung mit Formaldehyd und Natriumborhydrid in tertiäre Amine überführt. Die Dimethylprotein - Stammlösungen wurden, nach mehrtägiger Dialyse gegen bidest. H₂O, unmittelbar als Enzymsubstrate verwendet. Vorheriges Lyophilysieren, wie von MEANS und FEENEY empfohlen, erwies sich als nicht notwendig. Die mit 10⁻⁴_m Merthiolat(Na-Salz der Äthylmercurithiosalicylsäure) konservierten Lösungen halten sich im Kühlschrank mehrere Monate.

2.2.2. Analytische Reagenzien

2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure p.a.	SERVA, Heidelberg
Jodacetamid, rein	"
Trichloressigsäure p.a.	MERCK, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	"
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	"
Hydroxylamin-HCl p.a.	"

α -Ketoglutar säure	BOEHRINGER, Mann- heim
NADH, di-Na-Salz	"
Glutamatdehydrogenase (GDH)	"
Ninhydrin p.a.	MERCK, Darmstadt
Thioglykolsäure	"
Aminosäuren - Testgemisch (2,5 mM ./AS)	BECKMAN INSTRUMENTS, München
Aquasol (Szintillator - Fertigcocktail)	NEN Chemicals, Frankfurt

2.2.3. Reagenzien für die Diskelektrophorese

Acrylamid, reinst	SERVA, Heidelberg
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	"
N,N',N'',N'''-Tetramethyläthylendiamin	"
Coomassie Brillant Blau G 250	"
Riboflavin für biochemische Zwecke	MERCK, Darmstadt
Amidoschwarz 10 B	"

2.2.4. Reagenzien für proteinchemische Untersuchungen

Bernsteinsäureanhydrid purum	FLUKA, Buchs
Tetranitromethan p.a.	"
5-Aminotetrazol x H ₂ O purum	"
Natriumtetrathionat x H ₂ O purum	"
1,4-Dithioerythrit für biochemische Zwecke	MERCK, Darmstadt
Quecksilberacetat p.a.	"
Glycinäthylester . HCl	"
N-Äthyl-N'-(3-dimethylamino)-propyl- carbodiimid hydrochlorid (EDC) zur Synthese	"

N-Cyclohexyl-N'-β-(N-methyl)-morpho- linoäthyl-carbodiimid - p-toluolsulfat (CMC) zur Synthese	MERCK, Darmstadt
1-Acetylimidazol für biochemische Zwecke	"
Essigsäureanhydrid p.a.	"
2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid ("Koshlands Reagenz")	"
Diäthylpyrocarbonat Handelsname "Bay- covin"	BAYER, Leverkusen
Glycin-1- ¹⁴ C-äthylester x HCl (spez. Akt.: 6 mCi/mMol)	NEN Chemicals, Ffm.
Taurin (1,2 - ¹⁴ C) (spez. Akt.: 3 mCi/ mMol)	"
p-Nitro-benzylamin	Synthese nach 1.c. [35]
N-Brom-Succinimid	aus Laborbe- ständen
L-Nitrotyrosin	Synthese nach 1.c. [36]
Polyäthylenglykol Type 20 000	SERVA, Heidelberg
Visking-Dialysierschläuche Typen 8/32 und 36/32	"
Agarose - Gly-Gly-(OBz)Tyr-Arg	MILES-YEDA LTD. Rehovoth, Israel

2.3. Enzym

Der überwiegende Teil der proteinchemischen Unter-
suchungen wurde mit Papain (E.C. 3.4.4.10) für ana-
lytische Zwecke der Firma BOEHRINGER, Mannheim, durch-
geführt. Das Enzympräparat wird als Kristallsuspension
in 50 mM Na-acetat pH 4,5, 0,2 M Natriumchlorid geliefert.

Die spezifische Aktivität mit N^{α} -Benzoyl-L-arginin-äthylester als Substrat wird mit 30 U/mg (25° ; pH 6,2) angegeben. Je nach Alter der einzelnen Präparationen wurde eine spezifische Aktivität von 25 - 28 U/mg gemessen. Ein zu Beginn der Arbeit von SERVA bezogenes Präparat besaß eine spezifische Aktivität von 9 U/mg unter gleichen Bedingungen. Das Präparat von BOEHRINGER erwies sich in der Diskelektrophorese als vollständig einheitlich.

Ein Teil der Untersuchungen erfolgte mit affinitätschromatographisch nachgereinigtem Papain. Die Reinigung mit Hilfe von Agarose-Gly-Gly-(OBz)Tyr-Arg erfolgte nach BLUMBERG et al. [14].

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von nativem Papain und in Ausnahmefällen auch von Präparaten modifizierten Papains, kann durch die Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Die Extinktion für eine einprozentige Lösung beträgt bei dieser Wellenlänge 25 [37]. Bei einem Molekulargewicht von 23 405 ergibt sich ein molarer Extinktionskoeffizient von 58 500 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$].

Anwendung fand ferner die Mikrobiuretmethode [38] und die Methode nach LOWRY [39] besonders für sehr kleine Proteinkonzentrationen. Aufgrund des hohen Tyrosingehaltes

von Papain führen mit Rinderserumalbumin erstellte LOWRY-Eichkurven zu falschen Werten. Eichkurven wurden deshalb mit frisch bereiteten Reagenzien und einer, über die UV-Absorption eingestellten, Papain-Lösung aufgenommen.

Nach Modifizierung des Enzyms sind diese Methoden meist nicht verwendbar, da entweder die der Proteinbestimmung zugrundeliegenden Aminosäurereste chemisch verändert wurden (Tyr, Trp:LOWRY) oder eingeführte Chromophore bei den Messwellenlängen stark absorbieren (Mikrobiuret:330 nm). Da zur Abtrennung der eingesetzten Modifizierungsreagenzien meist Gelfiltrations-, Dialyse- und Konzentrierungsschritte mit wechselnden Proteinverlusten erforderlich sind, kann die anfangs eingesetzte Enzymmenge meist nicht zur Berechnung der Konzentration verwendet werden.

In dieser Arbeit dienten drei Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration modifizierter Proteine:

1) Modifizierung der Mikrobiuret-Methode

Die Extinktion der alkalischen Proteinlösungen wird vor und 15 min nach Zugabe des Kupferreagenzes jeweils gegen einen Leerwert ohne und mit Kupferreagenz gemessen. Der Absorptionsbeitrag der Chromophore bei 330 nm im Alkalischen wird von der Gesamtabsorption abgezogen.

2) Modifizierung der 280 nm-Extinktionsmessung (am Beispiel von Nitrosuccinylpapain)

Die Konzentration der Nitrotyrosinreste in der Enzymlösung wird aus der Extinktion bei 428 nm bestimmt ($\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und daraus der Extinktionszuwachs

bei 280 nm berechnet: $\frac{E_{428}}{\epsilon_{428}} \cdot \Delta\epsilon_{280}$, wobei $\Delta\epsilon_{280}$

($3100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Nitrotyrosin bei 280 nm ist.

Für die Enzymkonzentration gilt dann:

$$[E] = \frac{E_{280} - \frac{E_{428}}{\epsilon_{428}} \cdot \Delta\epsilon_{280}}{\epsilon_{280}}$$

In der Diskussion wird auf die Fehlermöglichkeiten von beiden Methoden eingegangen.

3) Enzymkonzentrationsbestimmung mit Hilfe der Aminosäureanalyse:

Von den einzelnen Enzymproben der Versuchsserien wurden jeweils genau definierte Volumina hydrolysiert (siehe 2.4.4.1.) und wie unter 2.4.4.2. beschrieben chromatographiert. Da die Aminosäurezusammensetzung des Papains genau bekannt ist, kann aus den Peakflächen der aliphatischen Aminosäuren die Konzentration exakt berechnet werden.

2.4.2. Diskelektrophorese

Die erforderlichen Gele und Puffer wurden nach den Vorschriften von MAURER [40] hergestellt. Das "System 1" (Mittelporgel) wurde bei der Trennung von Succinylpapain und dessen Derivaten, "System 7" (Kleinporgel) oder "System 8" (Mittelporgel) für natives Papain oder dessen

noch basischere Derivate verwendet; Anfärbung mit Amidoschwarz oder Coomassie Brilliant Blau G 250 und elektrolytische Entfärbung erfolgte wie bei MAURER [40] beschrieben.

2.4.3. CD-Messungen

CD-Spektren - nur im Bereich von 260-200 nm - wurden von einigen Carboxyl-modifizierten Papain-derivaten aufgenommen. Die Elliptizität bei 222 nm sollte lediglich eine qualitative Aussage über eventuelle Konformationsänderungen als Folge der chemischen Modifizierung erlauben [41, 42].

2.4.4. Aminosäureanalyse

2.4.4.1. Protein-Hydrolyse

Zur Vermeidung der (normalerweise vollständigen) Zerstörung des Tryptophans bei der sauren Hydrolyse wurde eine Modifizierung der von MATSUBARA und SASAKI [43] angegebenen Methode entwickelt. Die gegen Wasser dialysierten Enzymproben (meist 2 ml) werden in Hydrolyseröhrchen mit dem gleichen Volumen 12 N HCl p.a. versetzt. Nach Zugabe von Thioglykolsäure (5 % des Gesamtvolumens) werden die Lösungen je 10 min vorsichtig (Gefahr des Schäumens) mit Argon spezial begast und 24 - 30 h im Trockenschrank bei 110 - 112°C hydrolysiert; nach Entfernung der HCl am Rotationsverdampfer bei max. 40°C

(ohne Stickstoff- oder Argonbegasung) wurden die Proben in 4 ml Probenauftragepuffer pH 2,2 aufgenommen. Zu jeder Versuchsserie gehörte wenigstens ein Kontrollansatz nativen Enzyms.

2.4.4.2. Analyse

Verwendete Harze: Custom Research Resin AA 15, BECKMAN M 72, M 81 und M 82.

Die zur Elution verwendeten Puffer entsprachen zum Teil den von STEIN und MOORE [44] bzw. den in [45] angegebenen Systemen. Zur Chromatographie der Aminosäuren Cysteinsäurebis Valin auf der langen Säule mußte der erste Elutionspuffer sehr genau eingestellt werden (pH $3,28 \pm 0,01$), während der zweite Elutionspuffer in weiten pH-Bereichen zwischen 3,85 und 4,35 variiert werden konnte. Bei Versuchsserien mit großem Probenanfall, besonders bei der Bestimmung von Tyrosin und Nitrotyrosin, wurde nur mit dem zweiten Puffer eluiert und auf die Auftrennung der oben genannten Aminosäuren verzichtet: einwandfrei auswertbar bleiben dann noch: Ile, Leu, Tyr, Phe und Nitrotyr. Tryptophan, Lysin, Histidin und Arginin wurden auf einer kurzen 7,5 cm-Säule (Harz: BECKMAN M 81) optimal aufgetrennt. (Elution mit Citratpuffer pH 5,23 (0,35 m)).

2.4.4.3. Auswertung der Chromatogramme

Aus den Hydrolysaten nativer Proteine (Kontrollen) wurden zunächst mit Hilfe der bekannten Aminosäurezusammensetzung "praktische" C_{HxW} -Werte (Quotient aus Peakfläche und Zahl der Reste einer Aminosäure im Molekül) ermittelt. "Praktische" C_{HxW} -Werte sind (willkürliche) Proportionalitätskonstanten, die nicht nur die relativen 570/440 nm-Farbausbeuten der einzelnen Aminosäure/Ninhydrin-Reaktionsprodukte enthalten, sondern auch den Zerstörungsgrad der einzelnen Aminosäuren bei der Hydrolyse oder einen durch unvollständige Hydrolyse bestimmter Peptidbindungen auftretenden Verlust berücksichtigen.

Die Peakflächen der aufgetrennten Hydrolysate modifizierter Enzyme, geteilt durch die zugehörigen "praktischen" C_{HxW} -Werte, ergaben "korrigierte Flächen", die proportional zur Konzentration der Reste im Enzymmolekül sind.

Die Quotienten aus "korrigierter Fläche" aliphatischer (nicht-modifizierbarer) Aminosäuren (Gly, Leu, Ile etc.) und der Zahl ihrer Reste im Molekül ergeben Flächenäquivalente, deren Mittelwert zur Berechnung der Zahl der Taurin-, Tyr-, Nitro-tyr-, Trp-, Lys- und His-Reste herangezogen wurden und deren Standardabweichung ein Maß für die Qualität der Analyse war:

$$\begin{array}{l} \text{Zahl der Reste einer} \\ \text{Aminosäure pro Molekül} \end{array} = \frac{\text{"Korrigierte" Fläche}}{\text{Mittelwert der Flächen-} \\ \text{äquivalente}}$$

2.5.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.5.5.1. Niedermolekulare Substrate

a) Estersubstrate

Die Papain-katalysierte Hydrolyse der unter 2.2.1. aufgeführten Estersubstrate wurde meist mit der pH-Stat Technik verfolgt. Die Substrate wurden in 0,1 M NaCl gelöst (1 - 80 mM) und nach Enzymzugabe mit N/50 bzw. N/100 NaOH in N/10 NaCl kontinuierlich titriert. Über pH 8 wurde zur Vermeidung der CO₂-Absorption unter Argon-Atmosphäre gearbeitet. Auf die kontinuierliche Titration der entstehenden Säure konnte manchmal verzichtet werden und statt dessen in ganz schwach gepufferten Substratlösungen einfach nur die Anfangsgeschwindigkeit der pH-Änderung direkt registriert werden (siehe 2.1.). Dieses Verfahren fand vor allem Anwendung, wenn verschiedene salzfreie Enzymproben ungefährr gleicher Proteinkonzentration nur auf ihre relative Aktivität untersucht werden sollten.

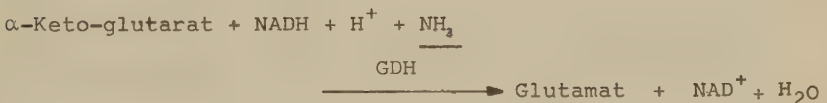
b) Chromogene Substrate (Nitranilid- und Nitrophenylester-Substrate)

Die Geschwindigkeit der Nitranilin- bzw. Nitrophenolbildung wird bei 410 bzw. 405 nm direkt photometrisch verfolgt. Wegen der beträchtlichen Spontanhydrolyse der Nitrophenylester wurde ihre Papain-katalysierte Spaltung im Zweistrahlbetrieb gegen einen Leerwert mit allen Komponenten, jedoch ohne Enzym, gemessen.

Gestartet wurde die Reaktion in diesen Fällen durch Zugabe der Substrate in absoluten organischen Lösungsmitteln (Aceton, Dioxan, DMSO, DMF). Da niedermolekulare Mercaptane die Hydrolyse der Nitrophenylester gleichfalls katalysieren, durften die Enzymproben nur mit äquimolaren Mengen DTE aktiviert werden.

c) N^{α} -Benzoyl-L-argininamid

Der bei der Spaltung des Amids freiwerdende Ammoniak wird im gekoppelten Test mit der Glutamatdehydrogenase (GDH) bestimmt:



Da dieser Test nur gelegentlich verwendet wurde, wird auf die genaue Beschreibung der Durchführung verzichtet; sie findet sich in [46].

2.5.5.2. Hochmolekulare Substrate

a) Kunitz-Test [5]

Substratlösung (2 ml): 5 mg/ml hitzedenaturiertes Casein, 5×10^{-3} m Cystein, 1×10^{-3} m EDTA, 0,05 m TRIS-Puffer pH 8,0. Die Casein-Verdauung wurde mit mindestens 3 verschiedenen Konzentrationen des gleichen Enzyms gemessen - je nach Aktivität der Proben - 5 - 100 µg Enzym. Nach 10 min Inkubation bei 37°C erfolgte Abbruch der Reaktion durch 3 ml 5% TCA. Nach Filtration des säureun-

löslichen Proteinanteils wurde im Überstand die 280 nm-Absorption gemessen. Die Beziehung zwischen Aktivität und Absorption wird durch eine (nichtlineare) Eichkurve vermittelt, die mit 8 verschiedenen Mengen (nativen) Enzyms erstellt wurde.

b) Mikroprotease-Test [34] ("Papain-Variante")

Prinzip: Die bei der Proteolyse freigesetzten Amino-
gruppen werden mit Trinitrobenzolsulfonsäure bestimmt.
(Die Aminogruppen der Substrate werden zuvor durch Dimethylierung in tertiäre Amine überführt, die nicht mehr mit TNBS reagieren).

Durchführung:

20 - 200 µg Enzym (je nach Aktivität) werden mit 1 ml einer EDTA/DTE-Lösung (je 1 mg/ml; pH 6,0) vorinkubiert. Nach ca. 10 min werden zu 50, 100 oder 200 µl dieser Lösung 1 ml Protein-Substrat (0,05 - 20 mg/ml) bei pH-Werten von 5 - 8 und Temperaturen von 25 - 40°C zugegeben. Nach Inkubationszeiten von 3 - 60 min wird die Reaktion durch 0,5 % Jodacetamid in 5 % KHCO_3 , pH 8,5, gestoppt. Nach ca. 5 min wird 1 ml 0,1 % Trinitrobenzolsulfonsäure und nach 30 min Inkubation bei 50°C im Dunkeln 1 ml 1 N HCl hinzugefügt. (Bei Dimethylcasein als Substrat war zuvor eine Zugabe von 10 % SDS (1 ml) erforderlich). Bei Gliadin als Substrat enthielten die erforderlichen Lösungen bis zu 60 % Äthanol; die Substratlösungen waren MOPS- oder MES-gepuffert mit 50 % Äthanol und die KHCO_3 /Jodacetamid-Lösung wurde durch Li-Veronal/Jodacetamid

in 30 % Äthanol ersetzt.

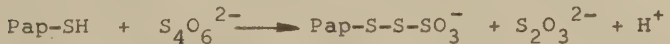
Die Extinktion wird bei 345 nm gegen einen Leerwert gemessen, der alle Komponenten enthält (einschließlich Enzym !); die Reihenfolge der Zugaben: 1. Substrat, 2. Jodacetamid wurde lediglich vertauscht.

2.6. Chemische Modifizierung des Enzyms

2.6.1. Vorbereitung des Enzyms

In den Fällen, wo außer dem Grad der Modifizierung einer Aminosäure, die dazugehörige spezifische (Rest-) Aktivität interessierte, mußte zuvor eine reversible Blockierung der essentiellen SH-Gruppe vorgenommen werden. Succinylierung des Enzyms (siehe 2.6.2.) wurde grundsätzlich mit dem nicht-aktivierten Enzym vor der Blockierung der SH-Gruppe durchgeführt.

- a) Umsetzung der SH-Gruppe zum Sulfenyl-Thiosulfat-Derivat.



Papain (1 mg/ml) oder Succinylpapain (10 mg/ml) wurde bei pH 7 (0,1 m Phosphat) mit einem etwa 10-fachen molaren Überschuß DTE aktiviert und anschließend gegen 5 L 1 mM $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ in 5 mM Acetat pH 4,5 oder 5 mM Phosphat pH 7,0 1 Tag dialysiert, danach nochmals einen Tag gegen $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ - freie Puffer dialysiert.

b) Mercuripapain

Anstelle von $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ wurde gegen eine Quecksilberacetat/Äthylendiamintetraacetat-Lösung (10 mM Hg^{++} /50 mM EDTA-Na pH 6,5) dialysiert und eventuell ausgefallene niedermolekulare Mercaptide vor erneuter Dialyse abzentrifugiert. Wenn im Folgenden nicht anders vermerkt, wurde das Sulfenylthiosulfatderivat oder das nicht-aktivierte Enzym verwendet.

2.6.2. Succinylierung des Enzyms

Die Succinylierung des Papains wurde durch Zugabe eines 100 - 150-fachen molaren Überschusses einer Bernsteinsäureanhydridlösung (1 M in abs. Aceton) zu einer Papain-Kristallsuspension (10 mg/ml) in 0,02 M Boratpuffer/0,1 M NaCl pH 8,0 bzw. pH 8,7 gestartet. Durch mehrfach wiederholte Zugabe des rasch hydrolysierenden Reagenzes wurde in den ersten 10 min ein etwa 100 - 150-facher molarer Überschuß aufrechterhalten. Der pH-Wert von $8,0 \pm 0,1$ bzw. $8,7 \pm 0,1$ wurde durch Zugabe von 1 N NaOH am pH-Stäten konstant gehalten. Größere Ansätze succinylierten Papains als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen wurden anschließend gegen Wasser dialysiert und bei Bedarf durch Dialyse gegen 15 % Polyäthylenglykol konzentriert. Zur Unterbrechung der Succinylierungsreaktion wurden im Abstand von 1 min aliquote Proben entnommen und in 0,2 M Acetatpuffer pH 4,0 gegeben. In diesen Proben wurde die Konzentration an freien Aminogruppen mit Trinitrobenzolsulfonsäure bestimmt [47].

ϵ -Aminocapronsäure diene als Standard.

Zum Test auf eventuell succinylierte phenolische OH-Gruppen des Tyrosins wurden 2 ml einer neutralen Succinylpapainlösung (ca. 0,2 mg/ml) mit 1 ml einer neutralen 2 M Hydroxylaminlösung versetzt; die Extinktion bei 280 nm wurde vor und 10 min nach der Hydroxylaminzugabe gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz ($\epsilon_{280} = 1160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Proteinkonzentration die Zahl der modifizierten Reste errechnet werden [48].

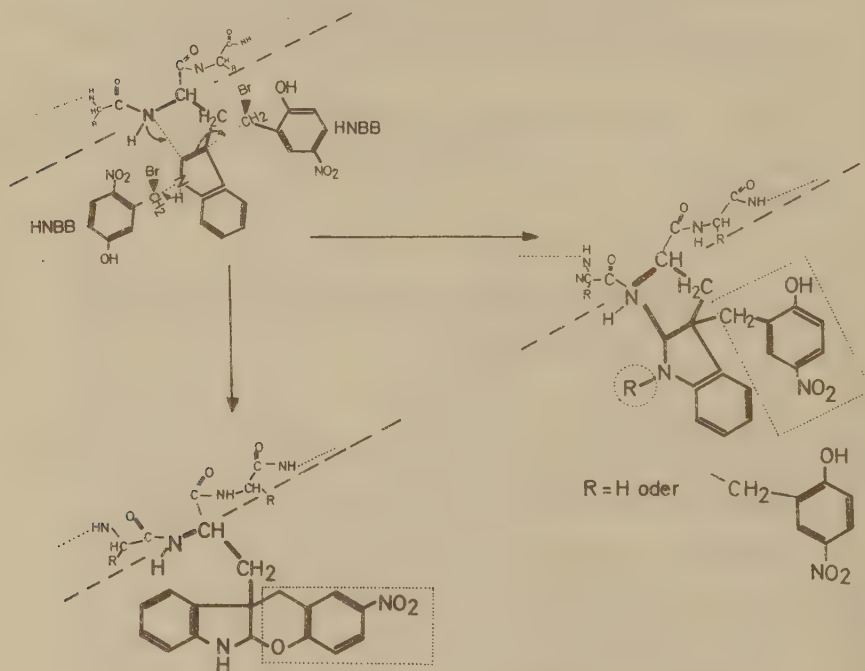
2.6.3. Acetylierung der phenolischen OH-Gruppen mit N-Acetyl-imidazol [49,50,51,52]

Papain bzw. Succinylpapain (1 bzw. 10 mg/ml) in 0,05 M Boratpuffer pH 7,5 wurde mit einem 5 - 100-fachen molaren Überschuß N-Acetyl-imidazol unter starkem Rühren (Mörser-tablette) versetzt. Bei Bedarf hielt der pH-Stat mit 0,5 N NaOH einen pH-Wert von 7,5 aufrecht. Nach einer halben Stunde wurde das Reagenz über eine gekühlte Sephadex G 25 medium - Säule, die mit 0,05 M Boratpuffer äquilibriert war, abgetrennt. Größere Ansätze des O-acetylierten Enzyms wurden gegen diesen Puffer bei 4°C dialysiert.

Nach Druckfiltration durch G 3 oder G 4 - Fritten konnte die Zahl der durch die Reaktion erfaßten Tyr-Reste photometrisch bei 280 nm bestimmt werden, wie unter 2.6.2. beschrieben.

2.6.4. Reaktion der Tryptophanreste mit Koshland's Reagenz [53]

Die Umsetzung der Tryptophanreste mit 2-Hydroxy-5-nitro-benzyl-bromid führt zu 3 Reaktionsprodukten [54, 55]:

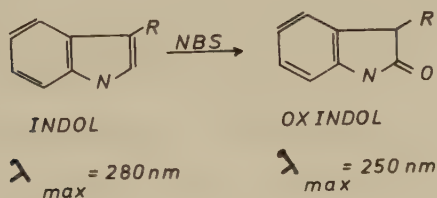


0,21 μMol Enzym in 2,5 ml 0,2 M Dimethylglutaratpuffer pH 3,6 wurden mit einem 10-150-fachen molaren Überschuß von 2-Hydroxy-5-nitro-benzylbromid (0,2 M Lösung in abs. Aceton) versetzt.

Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Proben zur

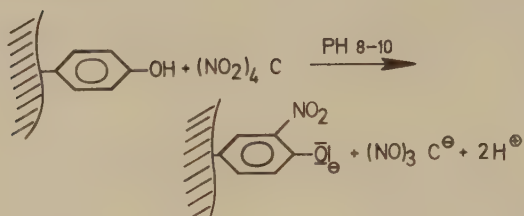
Entfernung der Reagenzien gegen Wasser dialysiert. Die Bestimmung des Modifizierungsgrades erfolgte durch Aminosäureanalyse.

2.6.5. N-Brom-succinimid (NBS)-Oxidation der Tryptophanreste



42 nMol Papain (nicht aktiviertes Enzym bzw. das Sulfenyl-Thiosulfat-Derivat) in 3 ml 0,2 M Acetatpuffer pH 4,0 - 5,5 wurden mit jeweils äquimolaren Mengen einer 0,1 %igen wässrigen N-Brom-succinimid-Lösung versetzt. Nach jeder Reagenz-Zugabe wurde ein UV-Spektrum von 320-230 nm aufgenommen. Die Zugabe wurde abgebrochen, wenn keine Abnahme der Extinktion bei 280 nm oder wenn stärkere Abweichungen vom isosbestischen Punkt bei 365 nm zu beobachten waren. (Beginnende Nebenreaktionen wie z.B. Tyr-Bromierung.) Die Ermittlung der Zahl der oxidierten Tryptophanreste erfolgte sowohl aus spektroskopischen Daten nach l.c. [56], als auch durch Aminosäureanalyse.

2.6.6. Nitrierung des Enzyms mit Tetranitromethan [59]



Eine 0,25 mM Lösung (6 mg/ml) des succinylierten Enzyms in 0,05 m TRIS-oder 0,05 m Borat-Puffer pH 8,0 bzw. 0,5 m TRIS-Puffer pH 8,7 wurde mit 50 - 300-fachen molaren Überschüssen an Tetranitromethan (TNM) versetzt (0,84 m in abs. Äthanol). Nitroformat und Nitrotyrosinbildung wurden bei 350 nm und 428 nm mit Hilfe der Zwei-Wellenlängen-Automatik des Spektralphotometers registriert. In anderen Versuchsserien wurden bei pH 7,5 - 10, 80 -250 -fache molare Überschüsse angewandt. Zur Unterbrechung der Nitrierungsreaktionen wurden nach verschiedenen Zeiten aliquote Proben entnommen und entweder in eiskalten 50 mM Cystein-M/15 Phosphat-Puffer pH 6,5 oder in eiskalten 5 mM Tyrosin-0,2 M Boratpuffer gegeben oder der pH-Wert der Proben wurde mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 5,8 bzw. mit verdünnter Essigsäure auf pH 4,5 gebracht. (Nitro-succinylpapain ist bei diesem pH sehr schwer löslich und fällt aus).

Zur Bestimmung des Nitrierungsgrades des Proteins wurden folgende Methoden verwendet:

- 1) Extinktionsmessung bei 428 nm ($\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- 2) Extinktionsmessung am isosbestischen Punkt
bei 381 nm ($\epsilon = 2790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- 3) Aminosäureanalyse

Um einen möglichst verlässlichen "praktischen" C_{HxW} -Wert für Nitrotyrosin zu erhalten, wurden 5 mg natives Papain mit 1,1 μMol L-Nitrotyrosin (Papain:L-Nitrotyr = 1 : 5) unter den üblichen Bedingungen hydrolysiert.

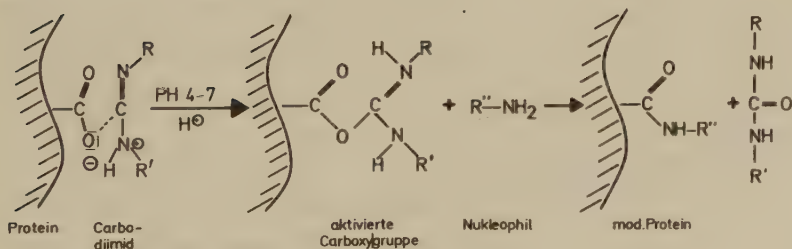
Die Bestimmung der Zahl der Tyrosin- Nitrotyrosin- und Tryptophanreste erfolgte wie unter 2.4.4.3. beschrieben.

Die Zahl der Tyr-Tyr-Quervernetzungen konnte nach

$$n_{\text{Tyr-Tyr}} = \frac{19 - n_{\text{Tyr}} - n_{\text{Nitrotyr}}}{2}$$

bestimmt werden. (19 = Zahl der Tyrosinreste im nativen Molekül.)

2.6.7. Carboxyl-Modifizierung mit wasserlöslichen Carbodiimiden und verschiedenen Nukleophilen [60]



Folgende Carbodiimide fanden Verwendung:

- 1) N-Cyclohexyl-N'-[β -(N-methyl)-morpholinium-äthyl]-carbodiimid-p-toluolsulfonat
- 2) N-Äthyl-N'-(3-dimethylamino)-propyl-carbodiimid-hydrochlorid

und folgende Nukleophile:

- 1) Glycin-l-¹⁴C-äthylester
- 2) Taurin (markiert und unmarkiert)
- 3) p-Nitro-benzylamin
- 4) Äthylendiamin, Pentamethylendiamin

In Gegenwart und Abwesenheit von Harnstoff wurden 20 mg Papain in 5 ml einer 0,2 - 2,0 m wässrigen Lösung des Nukleophils gelöst. Zur Unterbrechung der Modifizierungsreaktion wurden die Proben in 1 ml 2 M Acetatpuffer pH 4,5 überführt.

Der pH-Stat hielt während der Reaktion einen pH-Wert von $4,75 \pm 0,1$ mit 1 N HCl aufrecht.

Zur Entfernung der niedermolekularen Bestandteile mußten die Proben bis zu 5 Tage gegen Wasser dialysiert werden. Die Bestimmung der Zahl der umgesetzten Carboxylgruppen geschah wie folgt:

1) Diamine als Nukleophile

Die Konzentrationszunahme der Aminogruppen im Protein wurde mit der TNBS-Methode [47] bestimmt und daraus die Zahl der amidierten Carboxylgruppen errechnet.

2) p-Nitro-benzylamin als Nukleophil

Die Extinktion der Nitroaromaten bei 320 nm ($\epsilon = 2050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) diente zur Berechnung der erfaßten Carboxylgruppen.

3) nicht-markiertes Taurin als Nukleophil

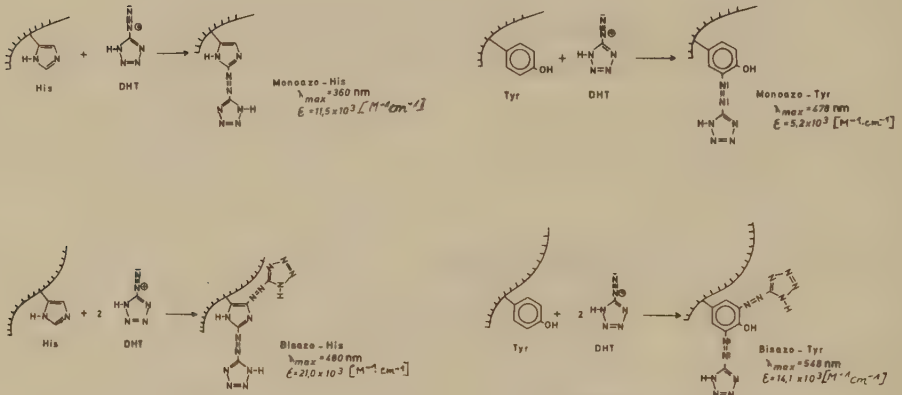
Die Zahl der eingebauten Taurinmoleküle wurde durch Aminosäureanalyse bestimmt. (Taurin ist sehr leicht von den anderen Aminosäuren [Cysteinsäure, Asparaginsäure] abzutrennen.)

4) markierte Nukleophile

Je 1 ml der dialysierten Proben wurden mit 15 ml Szintillator-Fertigcocktail Aquasol gemischt und im Szintillationszähler ausgezählt. (Bei Verwendung von Dioxan-Szintillator nach BRAY [61] war vorherige Gefriertrocknung der Proben, Hydrolyse mit 0,5 ml 1 N NaOH (15 h bei 50°C) und Ansäuern mit 0,5 ml 2 N TCA erforderlich.) Nach Zugabe von 20 µl eines Toluol- ^{14}C -Standards (9220 dpm/ 20 µl) zur Ermittlung der Zählausbeute wurden die Proben nochmals ausgezählt. Die Zählausbeuten waren $49 \pm 3 \%$ für den Dioxan-Szintillator und $74 \pm 2 \%$ für Aquasol.

Aus der spezifischen Radioaktivität des vorgelegten Nukleophils (8,8 µCi/mMol) für Glycin-äthylester und 5,1 µCi/mMol für Taurin) und den mit Hilfe der Zählausbeuten korrigierten Zählraten (dpm) der Proben und ihrer Proteinkonzentration läßt sich der Modifizierungsgrad errechnen.

2.6.7. Reaktion von Diazo-1H-tetrazol mit Papain und Succinylpapain



REAKTIONEN VON DHT MIT HIS- UND TYR- RESTEN

Diazo-1H-tetrazol-Lösungen wurden durch Diazotierung von 5-Amino-tetrazol nach l.c. [62] hergestellt und der Gehalt an Diazoniumsalz durch Umsetzung mit einem ca. 100-fachen N^α -Acetyl-Histidin-Überschuß bei pH 8,8 bestimmt. Ein molarer Extinktionskoeffizient von $1,1 \times 10^4$ bei 360 nm für das Monoazoderivat des Histidins lag der Gehaltsberechnung zugrunde [63].

Die Kupplung der Diazo-Verbindung mit Papain und dessen Derivate wurde im pH-Bereich 4,5 - 9,0 mit 20 - 800-fachen molaren Überschüssen vorgenommen. Bei Verwendung Harnstoff-freier Puffer erfolgte die Kupplung von (O-Acetyl-Tyr)-

Succinylpapain nur im pH-Bereich 7,3 - 7,9. Bei Bedarf - z.B. zur Untersuchung der Kupplungskinetik - wurde die Reaktion nach verschiedenen Zeiten durch 1 M TRIS-Puffer pH 7,5 (Triazenbildung) gestoppt.

Nach ausgiebiger Dialyse der Versuchsserien gegen Wasser bei 4°C wurden von aliquoten Proben Aminosäureanalysen erstellt und die Extinktion bei 550 nm (Bisazotyrosinmaximum) und 480 nm (Bisazohistidinmaximum) nach 1 : 6 und 1 : 10 - Verdünnung mit 0,2 M Boratpuffer pH 8,8 gemessen.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der Proben wurde nur die aus der Aminosäureanalyse ermittelte Proteinkonzentration herangezogen.

Aus den chromatographischen und photometrischen Daten konnte die Zahl der Mono- und Bisazoderivate von Histidin und Tyrosin errechnet werden. (Voraussetzung ist lediglich, daß Kupplungsprodukte von Trp und Lys bei obengenannten Wellenlängen keine Absorption besitzen.)

Das Prinzip der Berechnung sei an dieser Stelle kurz angeführt: Die Konzentration aller Azotyrosinreste, [AT], als Summe der Konzentrationen von Monoazotyrosin, [MAT], und Bisazotyrosin, [BAT], ergibt sich aus dem Tyrosin-Verlust der Aminosäureanalyse:

$$[AT] = [MAT] + [BAT] \quad (1)$$

für die Extinktion bei 550 nm gilt aber:

$$E_{550} = \epsilon_{MAT} \cdot [MAT] + \epsilon_{BAT} \cdot [BAT] \quad (2)$$

aus (1) und (2):
$$[BAT] = \frac{E_{550} - \epsilon_{MAT} \cdot [AT]}{\epsilon_{BAT} - \epsilon_{MAT}} \quad (3)$$

für $\epsilon_{MAT} = 1,3 \times 10^3$ und $\epsilon_{BAT} = 1,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(bei 550 nm)

$$[BAT] = \frac{E_{550} - 1,3 \times 10^3 \times [AT]}{1,28 \times 10^4} \quad (4)$$

und $[MAT] = [AT] - [BAT] \quad (5)$

Für die Zahl der Mono- und Bisazotyrosinreste im Enzymmolekül gilt:

$$n_{MAT} = \frac{[MAT]}{[E]} \quad \text{und} \quad n_{BAT} = \frac{[BAT]}{[E]}; \quad [E] = \text{Enzymkonzentration in Mol/l}$$

Die Extinktion bei 480 nm setzt sich aus den Extinktionsbeiträgen aller vier Chromophore zusammen (His-Symbole analog den Tyr-Derivaten):

$$E_{480} = \frac{\epsilon_{MAH} \cdot [MAH] + \epsilon_{BAH} \cdot [BAH] + (\epsilon_{MAT} \cdot n_{MAT} + \epsilon_{BAT} \cdot n_{BAT}) \cdot [E]}{\epsilon_{BAH} - \epsilon_{MAH}} \quad (6)$$

Resultat der Aminosäureanalyse (Histidin-Verlust):

$$[AH] = [MAH] + [BAT] \quad (7)$$

Aus (6) und (7) ergibt sich:

$$[BAH] = \frac{E_{480} - \epsilon_{MAH} \cdot [AH] - (\epsilon_{MAT} \cdot n_{MAT} + \epsilon_{BAT} \cdot n_{BAT}) \cdot [E]}{\epsilon_{BAH} - \epsilon_{MAH}} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \text{mit } \epsilon_{\text{MAH}} &= 1,1 \times 10^3 \\ \epsilon_{\text{BAH}} &= 2,1 \times 10^4 \quad (\text{für } 480 \text{ nm}) \\ \epsilon_{\text{MAT}} &= 5,2 \times 10^3 \\ \epsilon_{\text{BAT}} &= 7,1 \times 10^3 \quad (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \end{aligned}$$

ergibt sich:

$$[\text{BAH}] = \frac{\epsilon_{480} - 1,1 \times 10^3 \cdot [\text{AH}] - [\text{E}] (5,2 \times 10^3 \cdot n_{\text{MAT}} + 7,3 \times 10^3 \cdot n_{\text{MAT}})}{2 \times 10^4} \quad (9)$$

$$[\text{MAH}] = [\text{AH}] - [\text{BAH}] \quad (10)$$

Für die Zahl der Mono- und Bisazohistidinreste im Enzymmolekül gilt:

$$n_{\text{MAH}} = \frac{[\text{MAH}]}{[\text{E}]} \quad n_{\text{BAH}} = \frac{[\text{BAH}]}{[\text{E}]}$$

2.6.8. Sonstige Modifizierungsreaktionen

Folgende Einzeluntersuchungen, bei denen eine Bestimmung des Modifizierungsgrades nicht vorgenommen wurde, sollten lediglich ergänzende Informationen liefern:

- a) Behandlung des Enzyms mit bis zu 1500-fachen molaren Reagenzüberschüssen an Diäthylpyrocarbonat bei pH 6,0 zwecks Modifizierung der Histidinreste [64, 65]
- b) Veresterung der Carboxylgruppen mit Triäthylloxonium-tetrafluoroborat (Meerwein-Salz) bei pH 4,5 - 5,0 [104].

3. ERGEBNISSE

3.1. Reversible Blockierung der essentiellen SH-Gruppe

Sulfenylthiosulfatderivat des Papains

Die Reaktion von Papain mit Natriumtetrathionat - wie unter 2.6.1. beschrieben - führte zu einem, in der Disk-elektrophorese einheitlichen, Produkt. Bei Anwendung höherer Tetrathionatkonzentrationen im Außendialysat (ab 20 mM) wurden zum Teil Nebenbanden beobachtet. Die spezifische Aktivität nach Reaktivierung entsprach bei Anwendung kleiner Reagenzkonzentrationen der des unehandelten Enzyms. Bei Temperaturen unter 30°C und pH-Werten von 6 - 6,5 blieben Alkylierungsmittel ohne Einfluß auf die Aktivität. Nach deren Entfernung durch Gel-filtration und anschließender Reaktivierung mit DTE konnte kein Aktivitätsverlust (des Pap-S-S-SC₃) im Vergleich zu einem nicht-aktivierten Kontrollpräparat (Pap-S-S-Cys) festgestellt werden.

Die Temperaturstabilität des Sulfenylthiosulfatderivates ist etwas geringer als die des nicht-aktivierten Papains: Nach einstündiger Inkubation bei 60°C und pH 7,0 lag die Aktivität 10 % niedriger als die der Kontrolle.

Mercuripapain

Das Mercuriderivat von Papain weicht in seinen Eigenschaften in folgenden Punkten vom Sulfenylthiosulfatderivat ab:

- 1) Nach Einwirkung von Alkylierungsmitteln wurde eine beträchtliche Inaktivierung beobachtet.
- 2) Die Temperaturstabilität entspricht etwa der des nicht-aktivierten Papains (Pap-S-S-Cys).

Die Reaktivierung beider Papain-Derivate erfolgt sehr schnell: Eine "lag-Phase" konnte nach Zugabe eines 100-fachen DTE-Überschusses im kontinuierlichen Test mit D,L-BAPA nicht gemessen werden. Beträchtliche "lag-Phasen" wurden allerdings bei "Sulphenylthiosulfat-azo-papain" Derivaten beobachtet.

3.2. Succinylierung der Lysinreste des Enzyms mit Bernsteinsäureanhydrid

3.2.1. Kinetik der Succinylierung

Die Kinetik der Succinylierungsreaktion des Papains mit Bernsteinsäureanhydrid bei pH 8 ist aus Abbildung 1 ersichtlich.

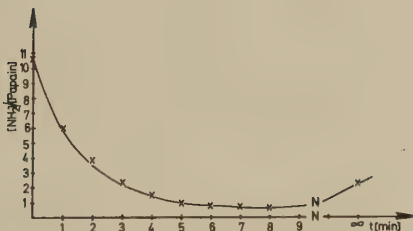


Abb. 1: Kinetik der Succinylierungsreaktion des Papains

Aufgetragen ist die Abnahme der freien Amino-gruppen, gemessen mit der TNBS-Methode, gegen die Zeit. Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid (1 M in abs. Aceton) erfolgte nach 1,5; 3,5; 5,5; und 7,5 min. Bedingungen: 0,02 M Boratpuffer pH 8,0, 10°C; Papainkonzentration 420 µM, Bernsteinsäureanhydrid/Papain = 110 bei Start der Reaktion

Von den 11 nach der Aminosäureanalyse im Enzym vorhandenen Aminogruppen, von denen eine vom aminoendständigen Isoleucin und 10 von Lysinresten stammen, wurden primär mindestens 10 von der Succinylierungsreaktion erfaßt.

Zwei der Bernsteinsäurereste werden offensichtlich leicht wieder abgespalten. Bei einer Reihe von Succinylierungsexperimenten im Temperaturbereich von 1 - 15°C fiel besonders auf, daß gegen Ende der Reaktion immer dann besonders hohe Succinylierungsgrade gefunden werden, wenn kurz (15 - 30 sec) nach der letzten Bernsteinsäureanhydridzugabe Proben zur Bestimmung der freien Aminogruppen entnommen wurden: In Gegenwart hoher Bernsteinsäureanhydridkonzentrationen ist offensichtlich die Geschwindigkeit der Succinylierung größer als die der autokatalytischen Abspaltung bestimmter Bernsteinsäurereste. Das Temperaturoptimum für eine maximale Acylierung liegt ungefähr bei 10°C.

Eine beständige Succinylierung einzelner Tyrosinreste fand offensichtlich nicht statt, das schließt allerdings nicht aus, daß während der Reaktion einzelne Tyr-Reste vorübergehend succinyliert wurden.

3.2.2. Eigenschaften des Succinylpapains

Löslichkeit

Während Papain im pH-Bereich 6,5 - 9 bei mittleren Ionenstärken ($I_{1/2} = 0,1 - 0,5$) eine sehr geringe Löslichkeit

besitzt (1 mg/ml) ist Succinylpapain ca. 10 - 25 mal besser löslich. Allerdings nimmt die Löslichkeit bei pH-Werten unter 7 mit sinkender Ionenstärke stark ab ($\Gamma/2 < 0,02$). Ein vollkommen entsalztes Succinylpapain besitzt im pH-Bereich 5,5 - 7,0 nur noch eine Löslichkeit von 3 mg/ml. Unter pH 5,5 sinkt sie erwartungsgemäß mit zunehmendem Protonierungsgrad der Carboxylgruppen weiter ab.

Vereinfacht kann festgestellt werden, daß höhere Ionenstärken ($\Gamma/2 = 0,15 - 0,7$) und höhere pH-Werte (6,0 - 10,5) die Löslichkeit von Succinylpapain, niedrige pH-Werte (3,6 - 4,8) und kleinere Ionenstärken ($\Gamma/2 = 0,01 - 0,04$) diejenige von Papain begünstigen.

Stabilität

Die Stabilität des Succinylpapains ist mit derjenigen des Papains vergleichbar; beobachtet wurde allerdings eine etwas erhöhte Temperaturlabilität, die sich zum Beispiel darin äußert, daß bei 60°C und pH 6,5 das nicht-aktivierte Succinylpapain im Gegensatz zum Papain nach einiger Zeit unter Ausflockung denaturiert. Eine geringfügige Zunahme der Selbstverdauung konnte nach Aktivierung gleichfalls beobachtet werden.

3.2.3. Vergleichende kinetische Untersuchungen am Papain und Succinylpapain mit nieder- und hochmolekularen Substraten

Eine Reihe orientierender Untersuchungen an verschiedenen succinylierten Enzympräparaten ergab, daß keine Aktivitätsminderung gegenüber hoch- und niedermolekularen Substraten eingetreten war, trotz einiger wesentlicher Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Enzymproteins. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die Succinylierung des Papains zum Teil sogar mit einer Verbesserung seiner katalytischen Eigenschaften verbunden ist.

Tab. 1: Kinetische Parameter und Aktivität des Succinylpapains

IEP [81]	Substrat: N ^α - Benzoyl-arg- äthylester (pH 6,5; 25°C)		anion. Substrat Casein (1 mg/ml)	kation. Substrat Protamin (5 mg/ml)
	K _m app. (Mol/l)	k _{cat} (min ⁻¹)	Aktivität*) bei pH 8,0 %	Aktivität **) bei pH 8,2 %
Natives Papain	9,6	1,8 x 10 ⁻²	485	100
Succinyl- Papain	4,3	1,2 x 10 ⁻²	505	120 ± 10
				200 ± 20

Aufgrund ihrer stark differierenden isoelektrischen Punkte erscheinen Papain und Succinylpapain als ideale Untersuchungsobjekte zur Klärung der Frage, welche Bedeutung

*) Kunitz-Test

**) pH-Stat-Test

die Oberflächenladung für die der Katalyse vorangehende Wechselwirkung des Enzymmoleküls mit "physiologischen" - also makromolekularen - Proteinsubstraten hat.

Es wurde deshalb versucht, Michaelis-Menten-Parameter der beiden Enzyme mit Proteinsubstraten sehr unterschiedlicher Eigenschaften über die Messung der freigesetzten Amino-
gruppen mit TNBS zu bestimmen: Als extrem basisches Substrat diente Protamin, als stark saures Substrat dimethyliertes Casein, als neutrales bis schwach saures Substrat dimethylierte Gelatine und Gliadin als Substrat, dessen Löslichkeitseigenschaften denen des Papains ähnlich sind: Beide Proteine sind in 50 - 70 % Äthanol löslich.

In Tabelle 2 ist die für die Substrate ermittelte Aminosäurezusammensetzung enthalten. Methionin, Cystin und Tryptophan wurden nicht bestimmt und blieben bei den prozentualen Angaben unberücksichtigt. Das eingesetzte Protamin erwies sich als vollständig Lysin-frei; eine Dimethylierung der endständigen Aminogruppen zur Erniedrigung der Leerwert-Extinktionen nach Reaktion mit TNBS war nicht erforderlich. Das gleiche gilt für Gliadin, das einen sehr geringen Lysin-Gehalt aufwies. Die Lysin-Reste des denaturierten Caseins konnten leicht dimethyliert werden, während trotz hoher Reagenzkonzentrationen und langer Reaktionsdauer nur etwa 50 % der Lysinreste der Gelatine dimethylierbar waren.

Tab. 2: Aminosäurezusammensetzung der Protein -Substrate in Prozent

	Protamin	Dimethyl- gelatine	Dimethyl- casein	Gliadin
IEP [67] ca.	12	5,0-5,5	4,0-4,2	-
Asp,Asn*,Glu,Gln*	0	13,7	27,5	42,6
Ser,Thr	5,6	6,5	13,7	7,2
Gly	4,0	36,7	3,7	2,7
Pro	5,3	15,3	12,4	14,4
Ala,Val,Ile,Leu	4,2	17,3	29,1	21,0
Tyr,Phe	0	2,5	7,0	7,2
Lys**	0	1,9 (3,7)	0,7 (6,1)	0,6
His	0	0,6	2,7	2,3
Arg	81,0	5,4	3,2	2,1

* Eine Bestimmung des Amid-Ammoniaks ergab, daß in Dimethylgelatine ca. 5 - 10 % von Asp und Glu als Asn und Gln vorlagen. Für Dimethylcasein wurden ca. 50 % und für Gliadin 95 % ermittelt.

** Werte in Klammern: vor Dimethylierung

Entscheidend für die Ermittlung kinetischer Parameter der Papain- und Succinylpapain-katalysierten Proteolyse war die Bestimmung möglichst "echter" Anfangsgeschwindigkeiten, da die Zahl der vom Enzym "sehr gut spaltbaren Bindungen" stetig abnimmt. In den Abbildungen 2 - 5 ist in a) und b) jeweils der zeitliche Verlauf der Freisetzung von Aminogruppen dargestellt. Alle Ansätze enthielten 1 µg Enzym, außer im Falle von Gliadin, wo 10 µg Enzym erforderlich waren.

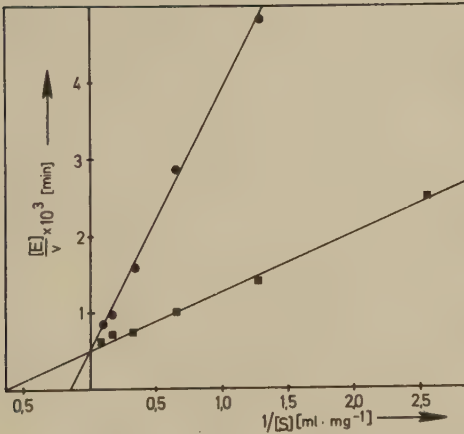
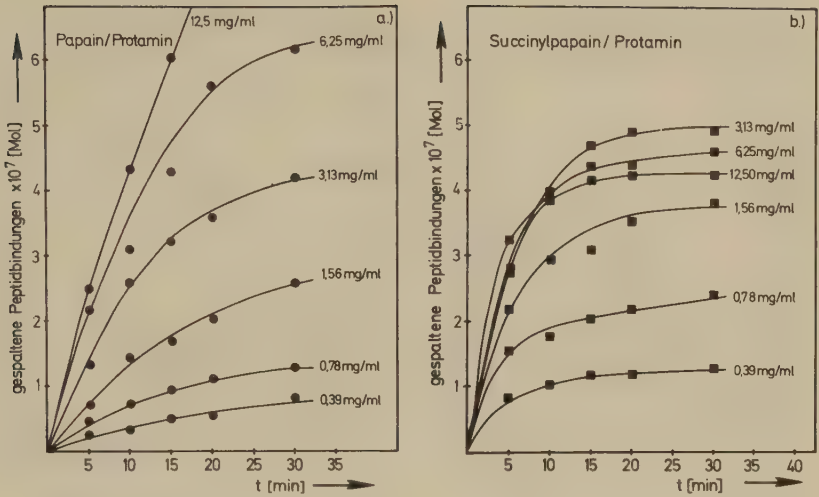


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der a) Papain- b) Succinylpapain-katalysierten Pro-ta-mi-n-Hydrolyse bei 6 verschiedenen Konzentrationen des Substrates, bei 35°C und pH 7,5 (0,1 m Phosphat). 1 ml Substratlösung enthält jeweils $4,3 \times 10^{-4}$ Mol Enzym. Die Bestimmung der Konzentration der freigesetzten Aminogruppen (= Zahl der gespaltenen Peptidbindungen) erfolgte mit der THBS-Methode [47].

c) Die Anfangsgeschwindigkeiten (in Mol gespalteener Peptidbindungen pro Mol Enzym und Minute) sind gegen die Substratkonzentrationen in einem Diagramm nach DALZIEL gegeneinander aufgetragen.

● ● ● Papain
■ ■ ■ Succinylpapain

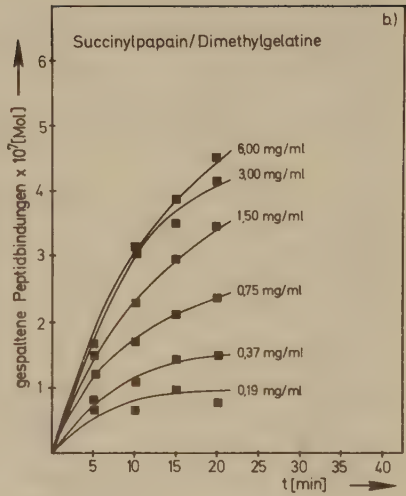
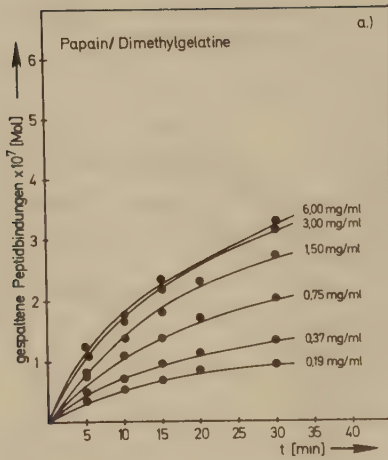
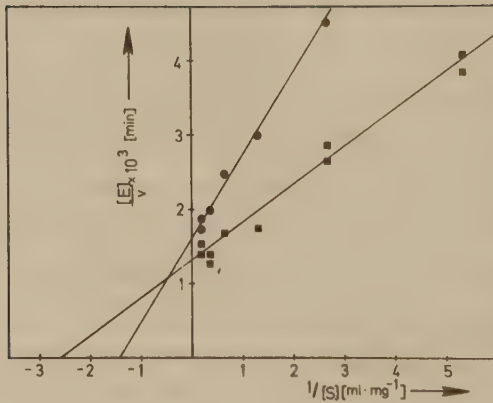


Abb. 3:

Reaktionsbedingungen
und Diagramme wie
in Abb. 2, jedoch
mit Dimethylgelatine
als Substrat.



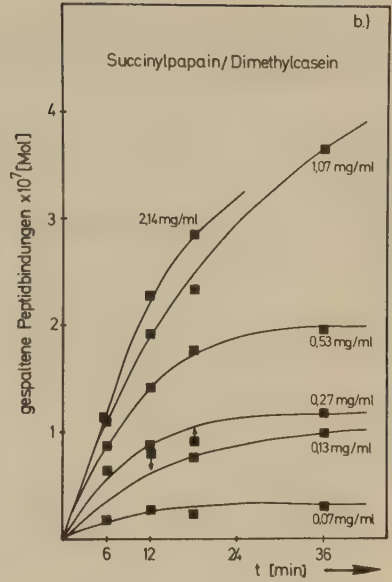
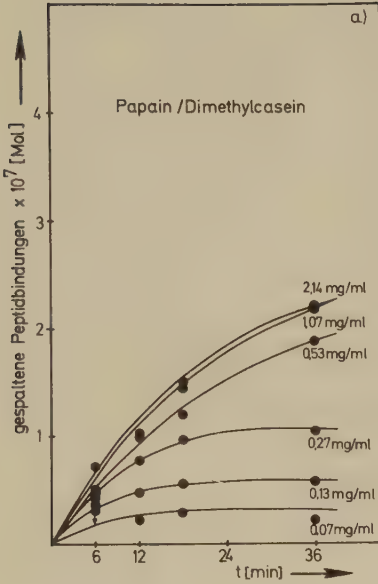
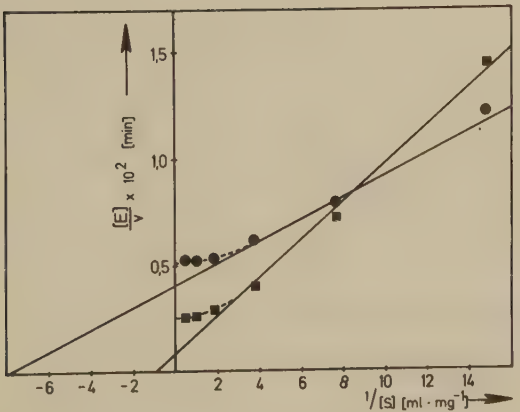


Abb. 4:

Reaktionsbedingungen und Diagramme wie in Abb. 2, jedoch mit Dimethylcasein als Substrat. Angedeutet ist die bereits bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen zu beobachtende "Substrathemmung" beider Enzyme.



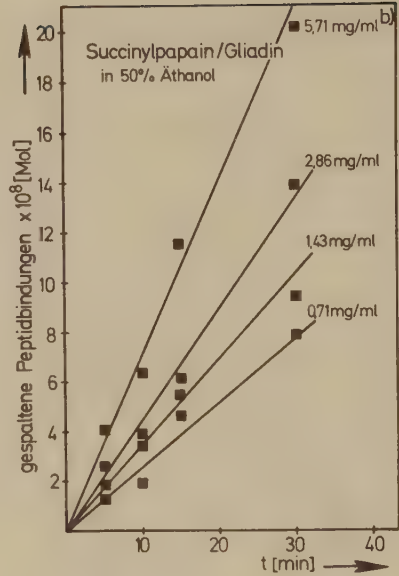
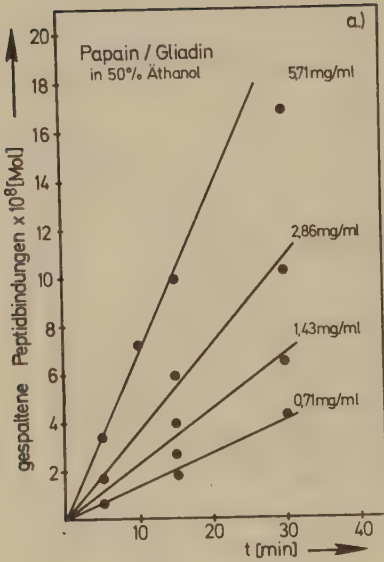
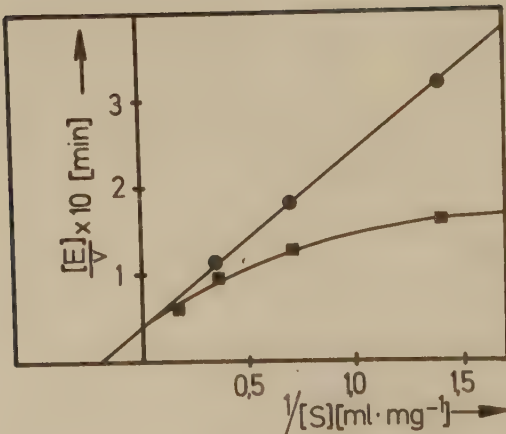


Abb. 5:

Zeitlicher Verlauf der
a) Papain- b) Succinyl-
papain-katalysierten
Hydrolyse von Gliadin
in 0,05 MOPS-Puffer,
pH 7,5, mit 50 % Ätha-
nol. In 1 ml Substrat-
lösung sind $4,3 \times 10^{-10}$
Mol Enzym enthalten.

c) Diagramm, wie in
Abb. 2.



"Anfangsgeschwindigkeiten" und Substratkonzentrationen sind in Diagrammen nach DALZIEL gegeneinander aufgetragen (Abbildungen c). Aus diesen Diagrammen können die reziproken k_{cat} und K_m -Werte direkt entnommen werden.

In der folgenden Tabelle sind die Michaelis-Menten-Parameter zusammengefaßt:

Tab.3: Michaeliskonstanten und katalytische Konstanten von Proteinsubstraten für Papain und Succinyl-papain.

Substrat	K_m [mg / ml]		k_{cat} [min ⁻¹]	
	Papain	Succinyl-papain	Papain	Succinyl-papain
Protamin	6,65	1,5	2×10^3	2×10^3
Dimethyl-gelatine	0,7	0,4	$6,1 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$
Dimethyl-casein	0,12	1,0	$2,5 \times 10^2$	$1,18 \times 10^3$
Gliadin	5	(5)	25	(25)

3.3. Acetylierung der Tyrosinreste mit N-Acetyl-imidazol

Wie aus Abbildung 6 zu ersehen ist, sind maximal 13 ± 1 Tyr-Reste des Succinylpapains acetylierbar. Bei der Einwirkung der in der Literatur [48] empfohlenen hohen Hydroxylamin-Konzentrationen zur Deacetylierung traten beim (O-Acetyl-Tyr)-Succinylpapain manchmal feinste, kaum sichtbare Trübungen auf, die als Ursache für die Streuung der Messwerte anzusehen sind. Eine Zugabe von

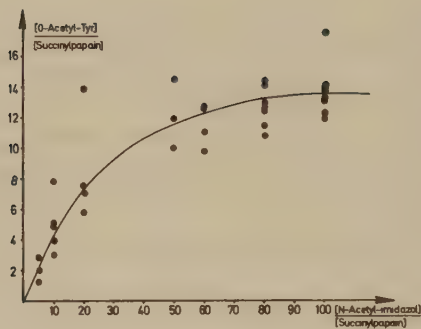


Abb. 6:

Acetylierung der phenolischen OH-Gruppen des Succinylpapains (5 mg/ml) in Abhängigkeit vom N-Acetylimidazol-Überschuß. Reaktion bei 25°C und pH 7,5 (0,05m Boratpuffer) unter pH-Stat Kontrolle. Reaktionsdauer 40 min. Bestimmung der Zahl der erfassten Reste nach [48].

2 % Glycerin war von Vorteil.

In 5 - 7 M Harnstoff konnten nicht mehr als 12 Tyr-Reste umgesetzt werden. Die Bestimmung der Zahl der so acetylierten Reste erfolgte allerdings nicht photometrisch, sondern mit Hilfe der Aminosäureanalyse: Acetylierte Proben und nicht-acetylierte Kontrollen wurden in 8 M Harnstoff mit Diazo-1H-tetrazol gekuppelt und der Tyr-Verlust der Proben miteinander verglichen (siehe 3.6.).

Eine relativ rasche Deacetylierung von 2-3 O-Acetyl-Tyr-Resten bei pH-Werten über 8,2 wurde beobachtet, ferner wurde festgestellt, daß Phosphationen die Deacetylierung sehr effektiv katalysieren. Phosphatpuffer sind deshalb für Tyrosinacetylierungs-Experimente nicht geeignet.

Einen entgegengesetzten Einfluß auf die Stabilität von O-Acetyl-Tyr-Resten hatte Harnstoff: Auch bei pH-Werten um 9,5 konnte in Gegenwart von 6 M Harnstoff keine signifikante Deacetylierung gemessen werden.

In gleicher Weise konnte auch für das nicht-succinylierte Enzym die Zahl der Lysinreste bestimmt werden, die durch Reaktion mit N-Acetyl-imidazol erfasst wurden. Bei hohen molaren Reagenzüberschüssen (120 - 150-fach) waren es maximal 5 Reste.

3.4. Reaktion der Tryptophanreste mit Koshland's Reagenz (HNBB).

Orientierende Vorversuche ergaben, daß oberhalb pH 3,5 chemische Reaktionen am Papain durchgeführt werden können, ohne daß Denaturierung eintritt. Kurzfristiges Absinken des pH-Wertes unter 3,0 im Verlaufe von 25-minütigen Reaktionen mit HNBB führten sofort zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß Papain unter pH 3,0 langsam und unter pH 2,6 rasch auch in Abwesenheit des Reagenzes inaktiviert wird. Die Berechnung der Modifizierungsgrade nach l.c. [53] unter Verwendung photometrischer Daten, führte nicht zu befriedigenden Ergebnissen, insbesondere konnte für Papain kein biphasischer Verlauf der Reaktion, nämlich schnelle Monosubstitution zugänglicher Tryptophanreste und nachfolgende langsame Zweitsubstitution mit deutlichem Knickpunkt gefunden werden [53]. Der in Abbildung 7 dargestellte Verlauf der Trp-Reaktion stützt sich deshalb ausschließlich auf die Aminosäureanalyse. Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, führt zunehmende Modifizierung der Tryptophanreste zu einem kontinuierlichen

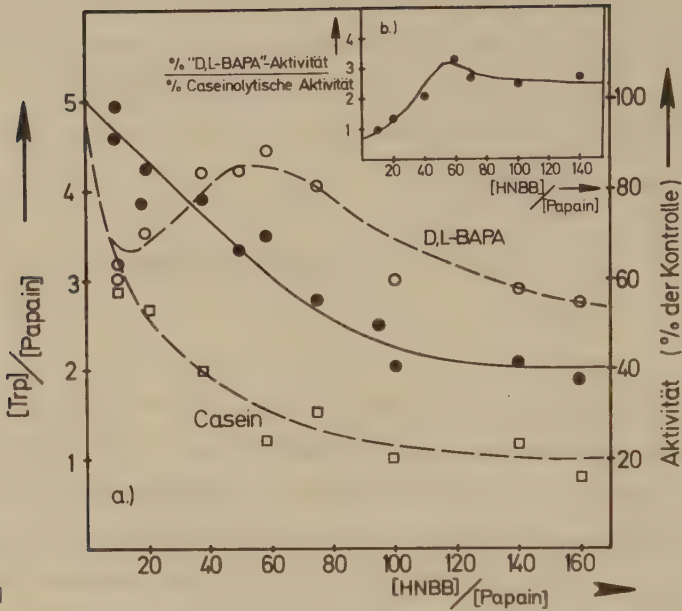


Abb.7: a) Modifizierung der Tryptophanreste mit Koshland's Reagenz in 0,2mDimethylglutaratpuffer pH 3,6 in Abhängigkeit vom Reagenzüberschuß. ●—●—Zahl der nicht umgesetzten Tryptophanreste; O---O—Aktivität; D,L-BAPA als Substrat, -□--□—Caseinolytische Aktivität b) Aufgetragen ist das Verhältnis der beiden Aktivitäten gegen den molaren Reagenzüberschuß.

Verlust der proteolytischen Eigenschaften des Enzyms.

Nach Umsetzung von 3 Tryptophanresten bleibt noch eine proteolytische Aktivität von weniger als 20 % im Vergleich zur Kontrolle.

Wesentlich komplexer ist der Verlauf der BAPA-Aktivitätskurve. Sie fällt im Bereich sehr kleiner molarer Reagenzüberschüsse zunächst wie die proteolytische Aktivität ab,

nimmt mit steigenden HNBB-Überschüssen jedoch wieder leicht zu und fällt dann nach Anwendung von 150-fachen molaren Reagenzüberschüssen parallel zum Verlauf der proteolytischen Aktivität auf etwa 50 % Restaktivität ab. Dieser Befund deutet darauf hin, daß sich die Hydroxynitrobenzylierung der drei zugänglichen, jedoch unterschiedlich reaktiven, Tryptophanreste sehr verschieden auf die Katalyse der Hydrolyse des chromogenen Substrates auswirkt.

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise eine kleine Population besonders modifizierter Enzymmoleküle mit stark erhöhter BAPA-Aktivität für den Verlauf dieser Aktivitätskurve verantwortlich war, wurde eine HNBB-behandelte Enzympräparation einer affinitätschromatographischen Auftrennung unterzogen

Verwendet wurde eine mit einem 60-fachen molaren Überschuß an HNBB hergestellte Enzympräparation (siehe Abb. 7 b). Nach Entfernung des Reagenzes und anschließender Aktivierung mit Mercaptoäthanol wurde die Chromatographie dieser Präparation an Gly-Gly-(O-Bzl)Tyr-Arg-Sepharose nach Angaben von BLUMBERG et al.[14] durchgeführt. Einzelheiten sind aus der Legende zu Abbildung 8 zu entnehmen.

Die Elutionsprofile und die dazugehörigen Volumaktivitäten des nativen und des hydroxynitrobenzylierten Papains, zeigen folgende auffallende Unterschiede:

1) Bei den Ionenstärken des 1. und 2. Elutionspuffers wird natives, aktivierbares Papain quantitativ vom trägergebundenen Inhibitor festgehalten. Eluiert wird ausschließlich nicht-aktivierbares Material. Im Gegensatz dazu wird ein beträchtlicher Anteil noch aktivierbarer, hydroxynitrobenzylierter Enzymmoleküle von der Sepharose nicht mehr gebunden.

Die spezifische Aktivität dieses Anteils beträgt etwa 25 % einer nativen, nicht affinitätschromatographisch nachgereinigten Kontrolle (D,L-BAPA als Substrat) bei einem Verlust von 2,2 Tryptophanresten.

2) Gebunden wird vom modifizierten Enzym nur noch ein Anteil von etwa 10 %. Dieser weist jedoch eine sehr hohe Volumaktivität auf. Die spezifische Aktivität (die hier als % [D,L-BAPA-Hydrolyse pro mg Enzym] im Vergleich zur Kontrolle zu verstehen ist) und der Modifizierungsgrad dieser sehr kleinen Fraktion, konnte aus der Absorption bei 410 und 280 nm bei pH 10,5 nach Angaben von KOSHLAND [53] geschätzt werden: Eine Aktivitätssteigerung auf 300 % ist verknüpft mit der Modifizierung nur eines Tryptophanrestes, der, nach den Absorptionsdaten zu schließen, wahrscheinlich als Hydroxynitrobenzyl-Monosubstitutionsprodukt vorliegt.

In Abbildung 8 b nicht mehr dargestellt ist eine kleine, noch aktive Proteinfraction, die nur mit 8 M Harnstoff eluierbar war. Sie wurde nicht näher untersucht; sie besitzt jedoch nach 410/280 nm - Schätzungen einen sehr

hohen Modifizierungsgrad (3 - 4 Trp-Reste modifiziert).

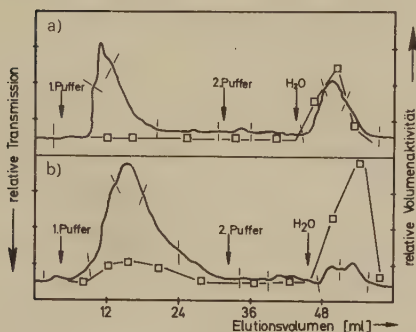


Abb. 8:

Gegenüberstellung der Affinitätschromatographie von nativem Papain-oben- und hydroxynitrobenzyliertem Papain-unten- (je 2 mg) an Sepharose-Gly-Gly-(O-Bzl) Tyr-Arg (1,1 ml). Säulendimensionen 0,8 x 2,5 cm. Flußgeschwindigkeit: 1,2 ml/min.
1. Puffer: 20 mM EDTA/10 mM Mercaptoäthanol pH 4,3
2. Puffer: 5mM EDTA pH 6,0

Transmission bei 280 nm mit Markierung des Fraktionswechsels;

rel. Volumenaktivität

(D,L-BAPA als Substrat). Da die Absolutänderung der Transmission kleiner als 0,15 ist, entsprechen die Peakflächen praktisch den Proteinkonzentrationen. In der unteren Abbildung ist der beträchtliche Absorptionszuwachs durch die eingeführten Chromophore zu berücksichtigen. Die Elutionsprofile wurden mit der unter 2.1. beschriebenen Geräte-Anordnung registriert.

3.5. Modifizierung der Carboxylgruppen von Papain.

Die Ergebnisse der Reaktion von Papain mit Äthylendiamin/Carbodiimid sind in Abbildung 9 dargestellt.

Aus den Densitogrammen und der Relation Restaktivität/Modifizierungsgrad folgt, daß nach Modifizierung von nur 0,5 - 1 von 13 Carboxylgruppen bei geringfügiger Änderung des elektrophoretischen Verhaltens bereits ein 25 %iger Aktivitätsverlust eintritt.

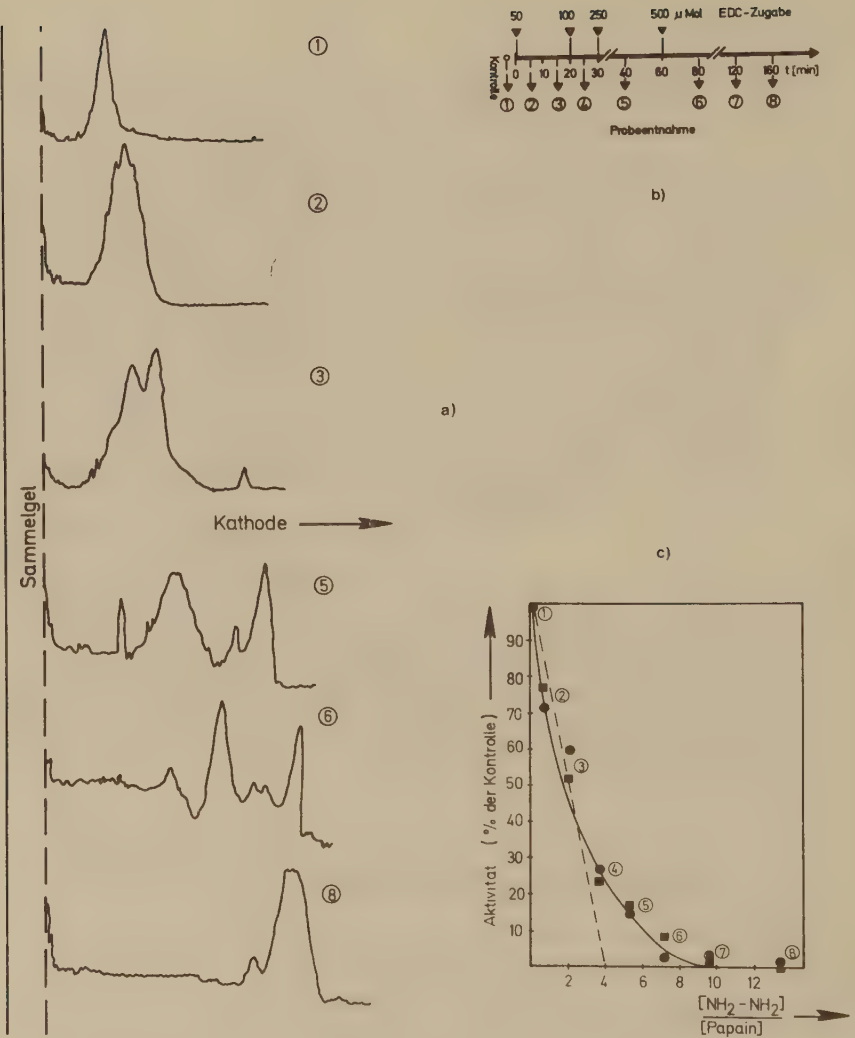


Abb. 9: Reaktion der Carboxylgruppen von Papain mit EDC/Äthylendiamin. 20 mg Enzym in 10 ml 2 M Äthylendiamin/2,5 M Harnstoff;
a) Analytische Diskelektrophorese von Papainderivaten verschiedenen Modifizierungsgrades. 50 - 150 μg Enzym wurden in einem Polyacrylamidgel mit 15 % Vernetzungsgrad ("System 7" nach MAURER [40]) bei pH 4,3 aufgetrennt. Anfärbung mit Amidoschwarz. Ausgewählte Densitogramme der Proben 1) bis 8).

- b) Graphische Darstellung von Carbodiimid-Zugabe und Probeentnahme (1 ml).
- c) Beziehung zwischen Modifizierungsgrad (Zahl der eingebauten Äthylendiaminmoleküle) und Restaktivität:
- Caseinolytische Aktivität (Kunitz-Test)
 - Aktivität gegen Benzoyl-L-argininamid.

Die fortschreitende Modifizierung führt dann zu Papain-derivaten sehr unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit.

Auffallend ist, daß mit zunehmender Abweichung von der gestrichelten Geraden in Abbildung 9 c, die Proteinheterogenität beträchtlich zunimmt, wie aus den Densitogrammen Nr. 5 und 6 zu ersehen ist. Da auch Reaktionen mit Carboxylgruppen, die für die Erhaltung der nativen Konformation des Proteins essentiell sind, nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden von den Proben Nr. 1 - 8 CD-Spektren aufgenommen. Die Elliptizität bei 222 nm sollte Auskunft über eine eventuelle Abnahme des Helixgehaltes im Verlaufe von möglichen Konformationsänderungen geben.

Bei den Proben 1 - 3 waren die CD-Spektren praktisch identisch, eine leichte Abnahme der Elliptizität ist bei Probe 4 zu beobachten. Sie nimmt über die Proben 5, 6, 7 stetig ab und ihr Verschwinden bei Probe 8 läßt auf den vollständigen Verlust der nativen Konformation nach Modifizierung aller 13 Carboxylgruppen schließen.

Die Reaktion der EDC- oder CMC-aktivierten Carboxylgruppen mit p-Nitrobenzylamin als chromophorem Nukleophil führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Eine 50 %ige Inaktivierung wird hier allerdings erst nach dem Einbau von mehr als

3 Chromophoren beobachtet.

Die Modifizierung der Carboxylgruppen mit Taurin (Amino-äthansulfonsäure), sollte zu Papainderivaten führen, die vor allem im pH-Bereich zwischen 3,5 und 5,5 eine beträchtlich höhere Löslichkeit als Papain und Succinylpapain aufweisen, um günstigere Voraussetzungen für proteinchemische Untersuchungen im schwach sauren zu schaffen. Die Löslichkeit nahm jedoch nach dem Einbau von nur 1,5 Sulfonsäuregruppen (^{14}C -Taurin als Nukleophil) wider Erwarten weiter ab. Gleichzeitig verminderte sich die caseinolytische Aktivität nur um 35 %. Ein etwas größerer Taurin-Einbau wurde mit Hilfe der Aminosäureanalyse gemessen. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß bei Verwendung kalten Taurins höhere Nukleophilkonzentrationen angewendet wurden. Nach Einbau von $2,4 \pm 0,4$ besaß das Enzym im Kunitz-Test [5] noch etwa 50 % Aktivität.

Eine kinetische Charakterisierung des Taurin-modifizierten Enzyms mit niedermolekularen Substraten war unmöglich, da das Enzymprotein bei der im Aktivitätstest notwendigen hohen Verdünnung spontan ausfiel. Die Anwesenheit von Proteinsubstraten wirkt sich offensichtlich günstig auf die Stabilität des modifizierten Enzyms aus.

Wesentlich eindeutigere Ergebnisse wurden durch Modifizierung mit ^{14}C -Glycinäthylester als Nukleophil erzielt.

Diese Reaktion ist auch die von den meisten Proteinchemikern angewendete Methode zur Aufklärung von Funktion und Zustand der Carboxylgruppen eines Proteins [41]. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 10 dargestellt. Daraus geht hervor, daß nach einer Reaktionszeit von 60 min bei einem Einbau von nur 0,8 Mol Glycin-Äthylester pro Mol Papain ein fast 50 %iger Aktivitätsverlust eintritt.

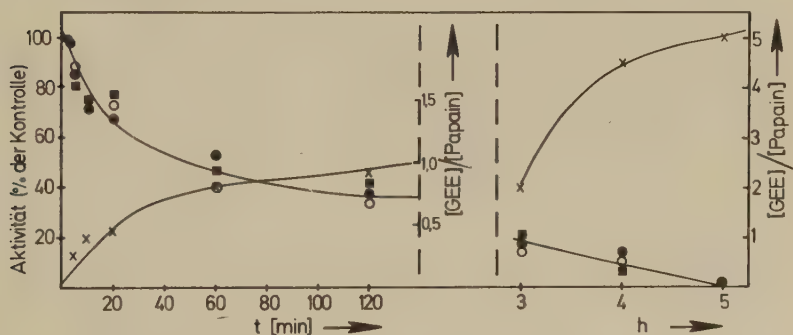


Abb. 10: Modifizierung der Carboxylgruppen von Papain mit EDC/Glycin-1-¹⁴C-Äthylester. (Reaktionsbedingungen: 20 mg Enzym in 10 ml 5,5 M Harnstoff mit 0,23 M ¹⁴C-Glycin-Äthylester (spez. Radioaktivität 8,8 µCi/mMol) werden mit 1 g EDC (fest) versetzt. (EDC-Konzentration = 0,12 M zu Beginn der Reaktion). Nach einer Reaktionsdauer von 2 h wird zum Rest des Reaktionsansatzes nochmals 1,5 g EDC hinzugefügt. Modifizierungsgrad (x) und Restaktivität sind gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. Bestimmt wurden die Aktivitäten mit D,L-BAPA als Substrat (●), dem neutralen Substrat BGEE (○) und die caseinolytische Aktivität (■).

Aus Abbildung 11 ersieht man, daß zwischen Restaktivität und Modifizierungsgrad bis zu einem Aktivitätsverlust von 75 % eine fast lineare Beziehung existiert. Aus der Extrapolation dieser Geraden auf die Abszisse ergibt sich

daß nach Modifizierung von nur 1,5 - 1,6 Carboxylgruppen von insgesamt 13 eine vollständige Inaktivierung erzielt wurde.

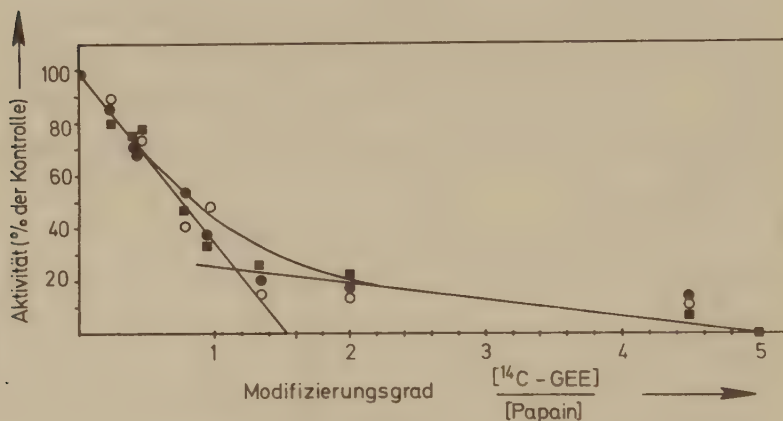


Abb. 11: Beziehung zwischen Restaktivität und Modifizierungsgrad aus Abb. 10. Symbole wie dort.

Zu berücksichtigen ist dabei vor allem, daß die Reaktion in Gegenwart von Harnstoff durchgeführt wurde, der im allgemeinen die unterschiedlichen Reaktivitäten verschiedener funktioneller Gruppen eher nivelliert. Im Falle des schlecht löslichen Papains war Harnstoff jedoch unbedingt erforderlich, damit die Reaktion von Anfang bis Ende in homogener Phase durchgeführt werden konnte.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß Harnstoff auf die native Konformation des Enzyms keinerlei Einfluß hat, wie Untersuchungen von SLUYTERMAN [66] gezeigt haben. Eigene Untersuchungen ergaben, daß die

beobachtete, scheinbare Aktivitätsminderung in 8 M Harnstoff nur auf die Beeinträchtigung der Substratbindung zurückgeführt werden kann. Das geht aus Abbildung 12 hervor, in der die Kinetik der Papain-katalysierten BAEE-Hydrolyse in Gegenwart und Abwesenheit von 8 M Harnstoff dargestellt ist. Die Michaelis-Konstante ist um den Faktor 10 erhöht, während die Maximalgeschwindigkeit unverändert bleibt.

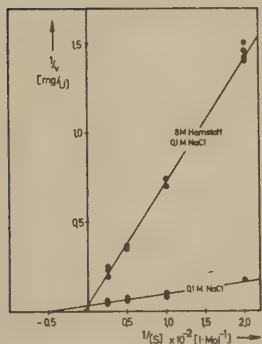


Abb. 12:

Kinetik der Papain-katalysierten BAEE-Hydrolyse in Gegenwart und Abwesenheit von Harnstoff, bei pH 6,8 und 25°C ($K_m = 1,8 \cdot 10^{-2}$; $K_{m\text{Harnstoff}} = 0,2 \text{ Mol/l}$).

3.6. Reaktion des Enzyms mit Diazo-1H-Tetrazol.(DHT).

Da DHT mit Tyrosin- und Histidinresten von Modellpeptiden unter sehr milden Bedingungen bei pH 8 - 9 rasch zu definierten, intensiv gefärbten Bisazo-Kupplungsprodukten reagiert, wurden in zahlreichen enzymologischen Untersuchungen über Funktion und Zustand dieser Reste ausschließlich sehr bequem zugängliche spektralphotometrische Daten zur Berechnung des Modifizierungsgrades

herangezogen. Zum Beispiel: [62, 63, 68]. Voraussetzung dieser Berechnungen ist, daß erfaßbare Tyr- und His-Reste in jedem Fall zu Bisazo-Kupplungsprodukten reagieren.

In Abbildungen 13 und 14 ist die Kinetik der Reaktion von DHT mit Succinylpapain bzw. (O-Acety-Tyr)-Succinylpapain graphisch dargestellt. Nach Aufhebung des phenolischen Charakters der Tyrosinreste im Succinylpapain (Abb. 14) sollte die Reaktion von DHT weitgehend auf die Histidinreste beschränkt bleiben.

Aus den beiden Abbildungen lassen sich folgende Ergebnisse entnehmen:

1) Die Aktivität gegenüber hochmolekularem Substrat (Abb. 13) nimmt zu Beginn der Reaktion sehr viel rascher ab als gegenüber niedermolekularen Estersubstraten.

Nach vorheriger Acetylierung der Tyrosinreste (Abb. 14) verlaufen die beiden Aktivitätskurven fast parallel.

Die Aktivitätsminderung durch die Kupplung reaktiver Tyrosinreste scheint danach ausschließlich sterischer Natur zu sein. Es wird in jedem Fall kein vollständiger Aktivitätsverlust am Ende der Reaktion gemessen.

2) Die gestrichelte Linie in Abbildung 13 läßt einen biphasischen Verlauf der Tyrosin-Kupplung vermuten; Monoazotyrosinreste (die nur zögernd zu Bisazoderivaten weiterreagieren) verfälschen offensichtlich die Bestimmung des "wahren" Bisazo-Histidingehaltes, aufgrund gleicher Absorptionsmaxima bei 480 nm. Deutlich wird dies auch aus der scheinbaren Abnahme der Bisazohistidin-Konzentration in Abbildung 13 (nach 10 min).

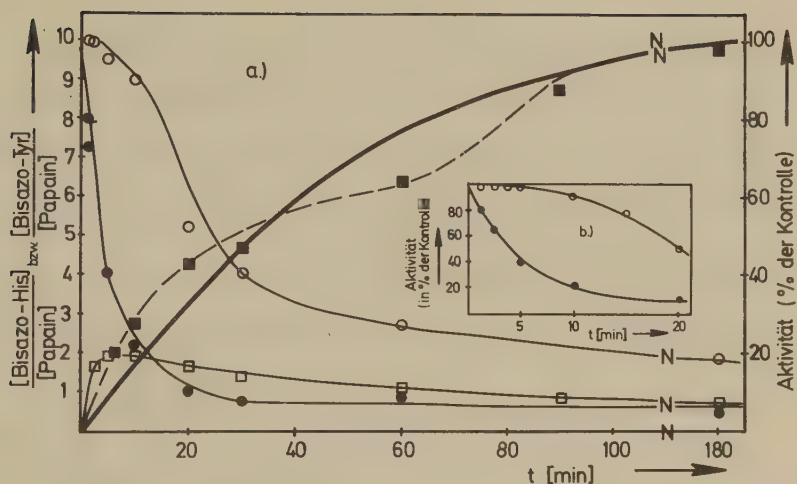


Abb. 13

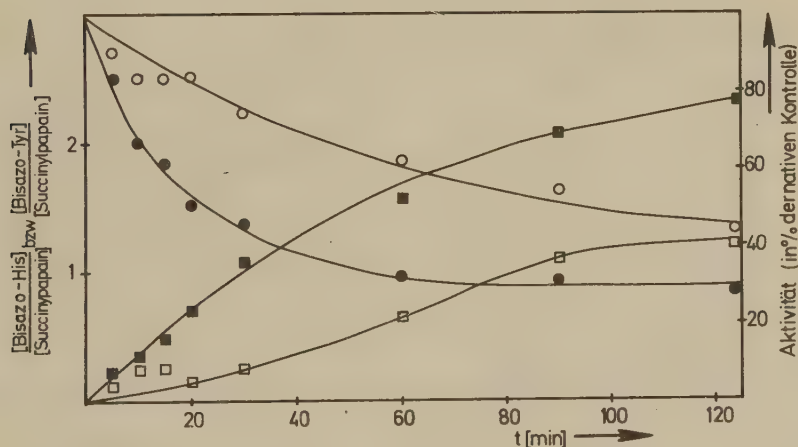


Abb. 13 und 14 Kinetik der DHT-Kupplung der His- und Tyr-Reste von Succinylpapain (Abb. 13) bzw. (O-Acetyl-Tyr)-Succinylpapain (Abb. 14) bei pH 8,5 bzw. 7,9 und 25°C mit einem 500-fachen Überschuß von DHT. Tyrosin-(■) und Histidin-(□) modifizierungsgrade wurden aus der Extinktion bei 480 nm und 550 nm nach SOKOLOVSKY und VALLEE [63] berechnet.

—●—●— Caseinolytische Aktivität; —○—○— Aktivität gegen BAEE. In Abb. 13 b ist der Verlauf der beiden Aktivitätskurven in dem Zeitraum dargestellt, der in Bezug auf die jeweils erzielten Modifizierungsgrade einen Vergleich mit Abb. 14 erlaubt.

3) 10 Tyrosinreste können zu Bisazoderivaten gekuppelt werden. Unter Berücksichtigung aller Fehlermöglichkeiten, die eine ausschließlich spektralphotometrische Auswertung der Modifizierung mit sich bringt, wurden maximal einer von 2 Histidinresten umgesetzt.

4) Trotz erschöpfender Acetylierung reagieren noch mindestens zwei Tyr-Reste zu Bisazoderivaten (Abb. 14).

In Abbildung 15 ist die pH-Abhängigkeit der Aktivität eines Perazopapains (Endprodukt aus Abb. 13) mit BAEE als Substrat, dem des nativen Papains gegenübergestellt.

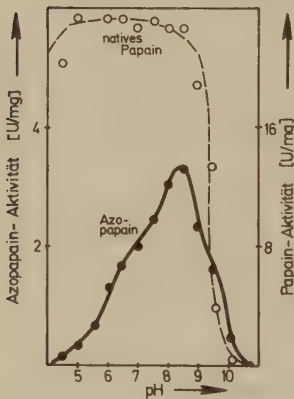


Abb. 15:

pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Azosuccinylpapain und nativem Papain. Zu beachten ist, daß die Azopapain-Ordinate nicht mit der Papain-Ordinate übereinstimmt: Das untersuchte Azoderivat besitzt nur eine Aktivität von 14 % des nativen Enzyms.

Der stark zu höheren pH-Werten verschobene "saure" Ast der Kurve des Azopapains läßt wenigstens 2 "Dissoziationsereignisse" erkennen.

DHT-Experimente, wie die vorliegenden, bei denen Modifizierungsgrade nur aus Extinktionswerten bestimmt wurden, ließen viele Fragen offen. Daher wurde bei einer Reihe von später durchgeführten Untersuchungen die Aminosäureanalyse aller Proben mit einbezogen.

Aufschlußreich sind die in Abbildungen 16 - 19 dargestellten pH-Abhängigkeiten der DHT-Kupplung vier verschiedener Reste, nämlich Histidin, Tyrosin, Tryptophan und Lysin, in Gegenwart und Abwesenheit von Harnstoff, jeweils ermittelt über Aminosäureanalyse.

Bei diesen Experimenten wurde zunächst weniger Wert gelegt auf vollständigen Umsatz aller zugänglichen Reste, als auf ein zuverlässiges pH-Profil ihrer Reaktivitäten. Reaktionszeiten und molare DHT-Überschüsse sind den Legenden zu entnehmen.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1) Histidin

In Abwesenheit von Harnstoff nimmt der Umsatz eines Histidinrestes zum Mono-azo-derivat im pH-Bereich 6,2-6,5 stark zu und im pH-Bereich um 7,5 wieder ab. Erst dann tauchen kleine Anteile Bisazokupplungsprodukt auf, parallel dazu steigt ab pH 7,2 die Restaktivität stetig an (Abb. 16). In Harnstoff wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, die Wendepunkte ("pK-Werte") der Kurven sind jedoch nach etwas höheren pH-Werten verschoben. Besonders auffallend ist, daß die Reaktion zum Bisazokupplungsprodukt nur in dem engen pH-Bereich von 7 - 8 stattfindet.

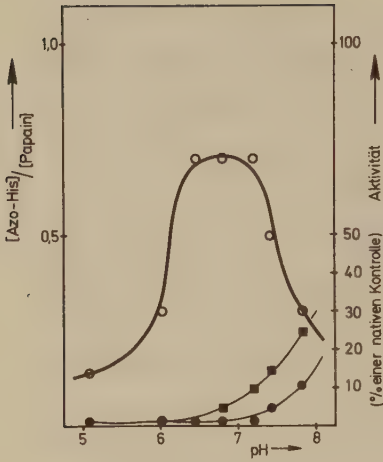


Abb. 16

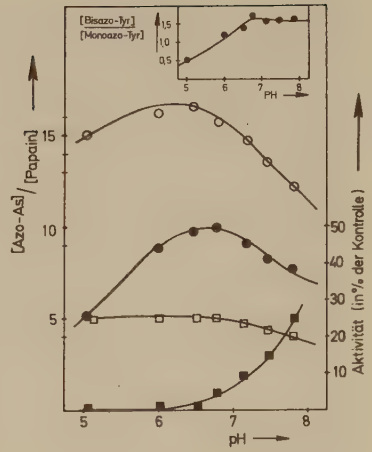


Abb. 17

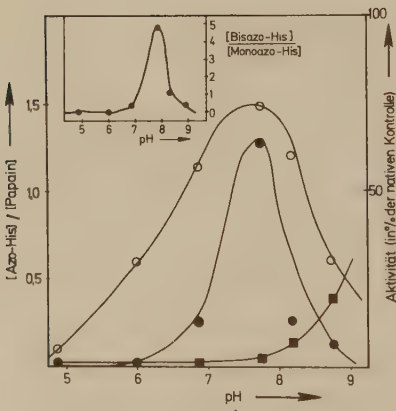


Abb. 18

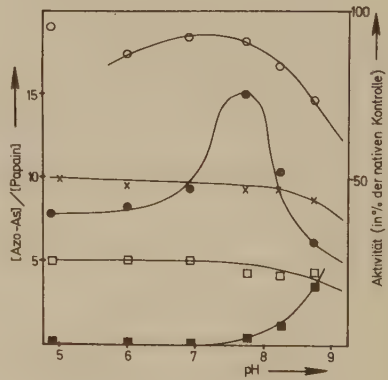


Abb. 19

Abb. 16 - 19: pH-Abhängigkeit der Reaktion von DHT mit verschiedenen Aminosäureresten von Succinylpapain (Abb. 16 und 17) bzw. Papain (Abb. 18 und 19). Reaktion von jeweils 5 mg Enzym mit 600-fachen molaren Reagenzüberschüssen in 3 ml 0,2 M Acetat-, Phosphat-, Borat- oder Hydrogencarbonat-Puffern. Kupplung von Papain in 7 M Harnstoff (Abb. 18 und 19). (30 min bei 25°C)

Abb. 16 und 18: —○—○—"Gesamt"-Azo-Histidin (Mono- und Bisazo-Histidin)

—●—●-Bisazo-Histidin

—■—■-Aktivität

Abb. 17 und 19: —○—○—"Gesamt"-Azo-Tyrosin (Mono- und Bisazo-Tyrosin)

—●—●-Bisazo-Tyrosin

—■—■-Aktivität

—□—□-Azo-Tryptophan

—★—★-Triazen des Lysins

2) Tyrosin

Die gesamte Kupplungsausbeute steigt ohne Harnstoff von pH 5 nach pH 6,5 leicht von 15 auf etwa 16,5 Reste an (von insgesamt 19 vorhandenen). Der Anteil der Bisazokupplungsprodukte beträgt nur 5 bzw. 10 Reste. Der Quotient aus Bisazo- und Monoazo-Resten nimmt dabei mit steigendem pH-Wert zu, obwohl die gesamte Kupplungsausbeute von pH 6,5 an wieder langsam abnimmt, bei pH 8,0 sind es nur noch 12 Reste, davon 8 Bisazokupplungsprodukte (Abb. 17).

Das pH-Profil in Gegenwart von Harnstoff ist gekennzeichnet durch einen Verlauf der dem der Histidinkupplung ähnelt. Auffallend ist unterhalb pH 7 und oberhalb pH 8 die hohe Zahl der Tyrosinreste, die nur zu Monoazoderivaten reagieren (Abb. 19).

3) Lysin

Die Reaktion der ϵ -Aminogruppen des Lysins zu Triazen-derivaten ist nur aus Abbildung 19 ersichtlich, da in Abwesenheit von Harnstoff die ϵ -Aminogruppen als Succinylderivate geschützt vorlagen. Bei pH 5 werden alle 10 Lysinreste umgesetzt; mit steigendem pH-Wert nimmt die Reaktionsbereitschaft eines Lys-Restes ab. Bei pH-Werten um 9 wird ein Rest nicht mehr erreicht.

4) Tryptophan

Vollkommen überraschend war der hohe Tryptophanverlust in der Aminosäureanalyse nach der Reaktion des Proteins mit DHT (Abb. 17 und 19). Zwischen pH 5 - 7 reagieren 5 Tryptophanreste, oberhalb pH 7 nimmt die Reaktivität eines Restes ab, so daß bei pH 8 noch 4 Reste erfaßt werden. In Harnstoffgegenwart ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede im pH-Profil.

Da in der Literatur kaum Hinweise über die Reaktion von DHT mit Tryptophanresten vorhanden sind, sollte durch eine weitere Versuchsserie Aufschluß über die Reaktivität von Trp-Resten im Vergleich zu der von Tyr- und Lys-Resten erhalten werden.

Die Untersuchungen wurden bei pH 9 in 7 M Harnstoff durchgeführt, also unter den relativ mildesten Bedingungen, die - wie aus den Abbildungen 16 - 19 zu entnehmen ist - zur höchsten Restaktivität führen, bei gleichzeitig kleinster Bisazo-tyr-Ausbeute und relativ geringster Tryptophan-Reaktivität. Die Reagenzkonzentrationen wurden so gewählt,

daß keinerlei Histidin-Kupplung stattfand.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen graphisch dargestellt.

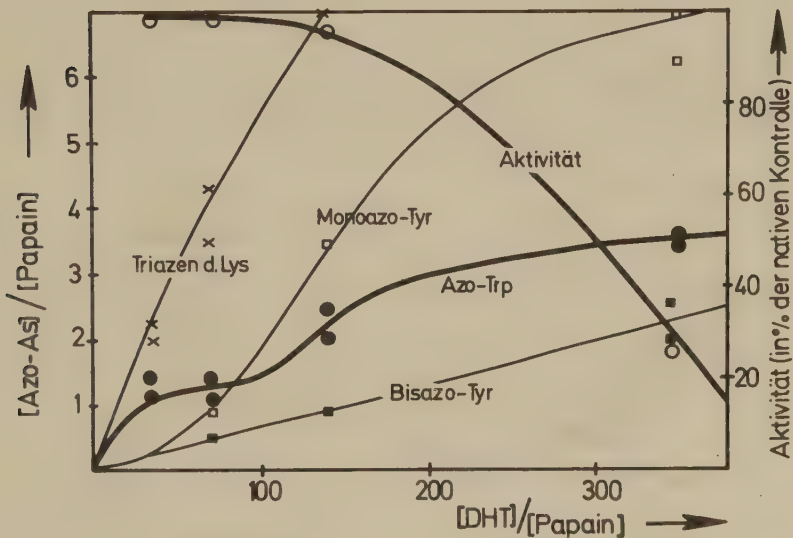


Abb. 20: Vergleich der DHT-Kupplung der Tryptophanreste mit der Kupplung anderer Reste im Papain, nach Anwendung verschiedener Reagenzüberschüsse. pH 9,0; 7 M Harnstoff, 40 min bei 25 C.

Die Reaktion zweier Tryptophanreste deutlich abgestufter Reaktivität hatte keinerlei Einfluß auf die Aktivität des Enzyms. Die bei einem etwas höheren Reagenzüberschuß erzielte Kupplung eines dritten Trp-Restes ist jedoch mit einer beträchtlichen Abnahme der Aktivität verknüpft. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß dann bereits zwei Tyrosinreste zu Bisazoderivaten gekuppelt haben und sechs

zu Monoazoprodukten.

Nach vorheriger erschöpfender Acetylierung der phenolischen OH-Gruppen des Succinylpapains, wurde unter den obengenannten Reaktionsbedingungen ein Derivat erhalten, dessen spektrale Eigenschaften mit denen eines Kupplungsproduktes aus Indolylessigsäure und DHT verglichen wurden. (siehe Abb. 21 - 23).

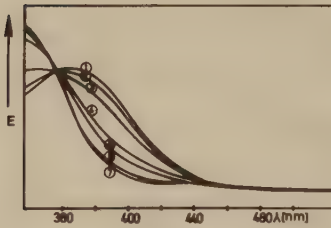


Abb. 21

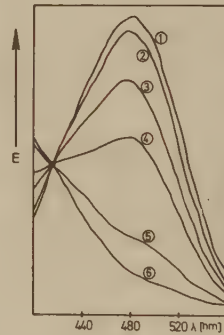


Abb. 22

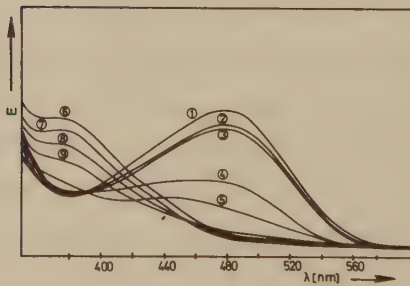


Abb. 23

Abb. 21: pH-Abhängigkeit des Spektrums von Azo-Indolyl-essigsäure. 1) pH 7,0 2) pH 7,5 3) pH 8,0 4) pH 8,5 5) pH 9,0 6) pH 9,5 7) pH 10,0.

Abb. 22: pH-Abhängigkeit des Monoazo-Tyrosin-Spektrums. 1) pH 11,0 2) pH 10,5 3) pH 10,0 4) pH 9,5 5) pH 7,5 6) pH 7,0

Abb. 23: pH-Abhängigkeit des Spektrums eines Azopapains mit 3 Azotryptophanchromophoren und ca. 3 Mono-azo-tyrosinchromophoren 1) pH 11,0 2) pH 10,5 3) pH 10,0 4) pH 9,5 5) pH 9,0 6) pH 7,0 7) pH 7,5 8) pH 8,0 9) pH 8,5.

Das Enzym enthält als Chromophore nur 3 Azotryptophanreste und maximal 3 Mono-azo-tyrosinreste. Die spezifische Aktivität beträgt 15 % der eines nativen Enzyms. Die Umsetzung der Indolyl-essigsäure mit DHT führte zu einem Reaktionsprodukt, das aufgrund seiner Schwerlöslichkeit im schwach sauren wässrigen Milieu und in den meisten organischen Lösungsmitteln leicht von den Ausgangssubstanzen abzutrennen war und chromatographisch rein dargestellt werden konnte. Die CHN-Analyse deutet unzweifelhaft auf ein Monosubstitutionsprodukt hin; die Konstitution konnte mit Hilfe von NMR-, IR- und Massenspektren noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die Vermutung von HOWARD et al. [69] und HIGGINS et al. [70], daß Diazoniumsalze relativ leicht mit Argininresten reagieren, bestätigte sich im Falle von DHT und Papain nicht. Auch nach der Reaktion bei pH 9,8 konnte kein signifikanter Argininverlust in der Aminosäure - analyse gefunden werden.

3.7. Modifizierung des Enzyms mit Tetranitromethan

Die Reaktion von Tetranitromethan mit nicht-aktiviertem Papain führte selbst bei Anwendung kleiner molarer Reagenzüberschüsse (5 - 20-fach) zu einem vollkommen unlöslichen Produkt, dessen kinetische Charakterisierung praktisch unmöglich war. Jedoch behält auch ein mit einem etwa 100-fachen molaren Reagenzüberschuß versetztes Enzympräparat noch mindestens 10 - 15 % seiner Fähigkeit zur Caseinverdauung.

Die Nitrierung des Succinylpapains hingegen, hat auch bei hohen Reagenzüberschüssen keinerlei Abnahme der Löslichkeit des Enzymproteins zur Folge.

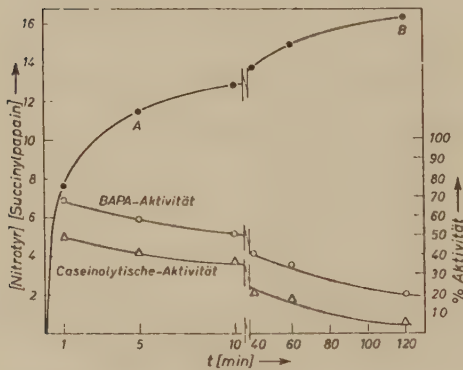


Abb. 24:

Reaktion von Succinylpapain (8 Aminogruppen succinyliert), SH-Gruppe geschützt als Sulphenyl-Thiosulfat-Derivat, mit Tetranitromethan. Bedingungen: 0,5 M TRIS pH 8,8; 30°C; TMN/Succinylpapain = 250. —○—○— Aktivität des modifizierten Enzyms mit BAPA als Substrat; —△—△— Caseinolytische Aktivität des modifizierten Enzyms. Auf

der Abszisse ist die Behandlungsdauer des Succinylpapains mit Tetranitromethan aufgetragen.

Abbildung 24 demonstriert den Zusammenhang zwischen Nitrierungsgrad und der Aktivität des Enzyms gegen zwei Substrate. Aus der halblogarithmischen Darstellung in Abbildung 25 geht die unterschiedliche Reaktivität der Tyrosinreste hervor.

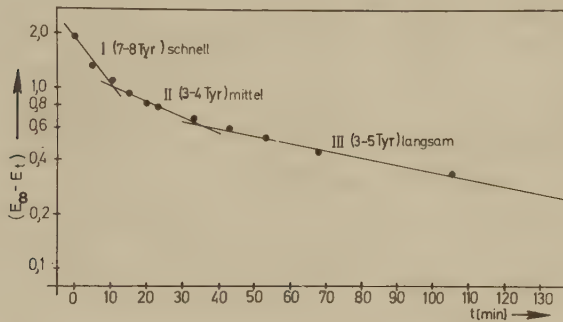


Abb. 25: Kinetik der Nitrierung der Tyrosinreste des Succinylpapains mit Tetranitromethan. Bedingungen: 0,1 M TRIS-Puffer 8,0; 25°C; TNM/Succinylpapain = 180

Hierbei wurden die Nitrierungsgrade der Proben zunächst aus der Extinktion der Nitrotyrosinreste bei 428 nm ($\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und pH 8,0 berechnet und unter Berücksichtigung des Tyrosinverlustes zweier ausgewählter Proben A und B in der Aminosäureanalyse korrigiert (siehe Abb. 24).

In Abbildung 26 sind die photometrischen Titrations dieser Nitrosuccinylpapain-Präparate einander gegenübergestellt.

Die aus diesen Titrationskurven ersichtlichen, beträchtlichen Abweichungen der pK -Werte einzelner Nitrotyrosinreste im Protein (pK_{int} des Nitrotyrosins 6,8) nach

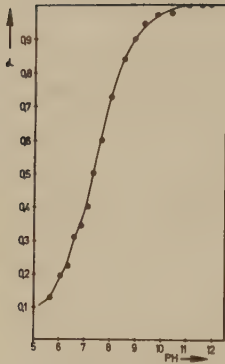
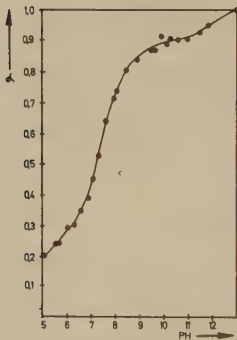


Abb. 26: Photometrische Titration von Nitrosuccinylpapain bei 440 nm in Teorell-Stenhagen-Puffer, $\sqrt{2}$ = 0,25. Kurve A Tyrosinverlust = 12; Kurve B Tyrosinverlust = 16.



oben und unten erklärte zum Teil auch die beträchtlichen Diskrepanzen zwischen Modifizierungsgraden, die aus 428 nm - Messungen hervorgingen und solchen, die durch Absorptionsmessung am isosbestischen Punkt (381 nm) ermittelt wurden.

(In Extremfällen ergab sich ein Unterschied von 6,5 Resten.)

Ein Vergleich der Spektren von N-Acetyl-Nitrotyrosin mit einem Nitrosuccinylpapain relativ niedrigen Modifizierungsgrades bei pH 8,0 (Abb. 27) demonstriert gleichfalls das 428/381 nm Mißverhältnis beim Nitroprotein, ob-

wohl die photometrische Titrationskurve eben dieses Präparates noch kaum Abweichungen von der idealen Nitrotyrosintitrationskurve erkennen läßt. Hinzu kamen offensichtliche Diskrepanzen zwischen Nitrotyrosin-Extinktion und Tyrosinverlust in der Aminosäureanalyse, die nicht allein durch atypische pK-Werte einzelner Nitrotyrosinreste (Abb. 26) erklärt werden konnten und die eine unabhängige

Bestimmung von Tyrosin und Nitrotyrosin erforderten.

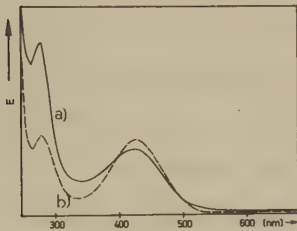


Abb. 27: Spektrum von a) Nitro-succinylpapain und b) N-Acetyl-Nitro-tyrosin pH 8,0.
(Tyrosinverlust: 7 Reste
Tryptophanverlust: 1 Rest).

Die folgende Tabelle enthält die bei verschiedenen TNM-Überschüssen und verschiedenen pH-Werten ermittelten Werte. Die Konzentration des Enzyms war 5 mg/ml; die Reaktion wurde 2 h bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Tabelle 4: Tyrosin- und Nitrotyrosingehalt von TNM-behandeltem Succinylpapain

$\frac{[\text{TMN}]}{[\text{Enzym}]}$	pH	$\frac{[\text{Tyr}]}{[\text{Enzym}]}$	$\frac{[\text{Nitro-Tyr}]}{[\text{Enzym}]}$
80	8,0	9,1	7,9
250	8,0	6,9	8,1
80	8,5	4,5	9,2
250	8,5	4,8	6,6
80	9,0	3,9	8,0
250	9,0	2,9	6,1
250	9,5	1,9	6,1
80	10,0	2,8	7,8
250	10,0	0,9	5,3

TNM-induzierte (radikalische) Tyr-Tyr-Quervernetzungsreaktionen, die vor kurzem von WILLIAMS et al. [71] am Beispiel des Ovotransferrins untersucht wurden, sind wahrscheinlich auch hier dafür verantwortlich, daß Tyrosinabnahme und Nitrotyrosinzunahme nicht parallel verlaufen. In Abbildung 28 ist das Ausmaß der Tyr-Tyr-Quervernetzung in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt,

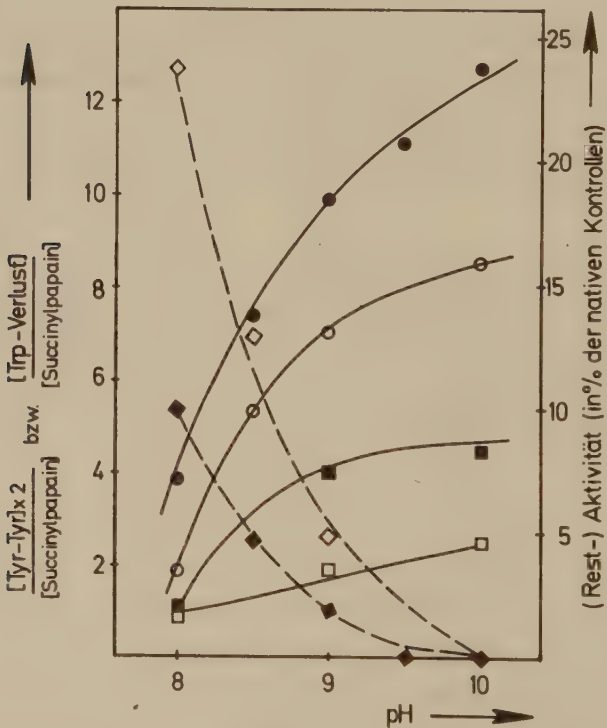


Abb.28: Tyr-Tyr-Quervernetzung (Diskrepanz zwischen Tyrosinabnahme und Nitrotyrosinzunahme) in Abhängigkeit vom pH-Wert bei zwei TNM-Überschüssen.

—●—●— Quervernetzungsgrad, —■—■— Trp-Verlust
 —◆—◆— Aktivität: bei 250-fachem Reagenzüberschuß,
 offene Zeichen: bei 80-fachem Überschuß.

unter der Voraussetzung, daß andere Aromaten (Phe, Trp) nicht in die Vernetzungsreaktionen mit einbezogen werden. Ein Phe-Verlust wurde zwar bei höheren pH-Werten beobachtet, er war jedoch in jedem Fall kleiner als 0,5 Reste pro Molekül.

Mit in Abbildung 28 aufgenommen wurde der Tryptophanverlust. Wie man sieht, reagiert bei pH 8,0, relativ unabhängig vom TNM/Enzym-Verhältnis. ein Tryptophanrest bei gleichzeitig sehr kleiner Quervernetzung der Tyr-Reste. Die sprunghafte Abnahme des Tryptophangehaltes bei einem TNM/Protein-Verhältnis von 250 ab pH 9,0, die in etwa parallel zur Zunahme der Quervernetzung geht, läßt unter diesen Bedingungen allerdings die Einbeziehung von Tryptophanresten möglich erscheinen.

3.8. Oxidation der Tryptophanreste mit N-Brom-succinimid (NBS)

Die Anwendung eines 7 - 8-fachen molaren NBS-Überschusses bei pH 4,0 führte zur Oxidation von 3, der insgesamt 5, im Molekül vorhandenen Tryptophanreste.

Selbst bei diesen niedrigen Reagenzkonzentrationen sind beträchtliche Abweichungen vom isosbestischen Punkt des Indol/Oxindol-Systems bei 265 nm zu beobachten. Außer der unterschiedlichen Beeinflussung spektroskopischer Eigenschaften verschiedener Oxindol-Chromophore durch

Nachbargruppen, sind vor allem unerwünschte Nebenreaktionen für die Auswanderung des isosbestischen Punktes verantwortlich zu machen.

So werden bei nur geringfügig höheren Reagenzüberschüssen (12-fach) sehr wahrscheinlich 2 Tyrosinreste angegriffen; aufgrund des hohen Tyr-Gehaltes - 19 Reste pro Molekül - ist die genaue Ermittlung etwas erschwert: Die Zahl der nach der Reaktion in der Aminosäureanalyse gefundenen Reste schwankt zwischen 16,1 und 17,5.

Die Oxidation aller 5 Trp-Reste in 8 M Harnstoff mit NBS, bei der das eigentlich oxidierende Agens N-Brom-Harnstoff ist [57], verläuft ohne Nebenreaktion. Dies geht auch aus den Reaktionsspektren der folgenden Abbildung hervor.

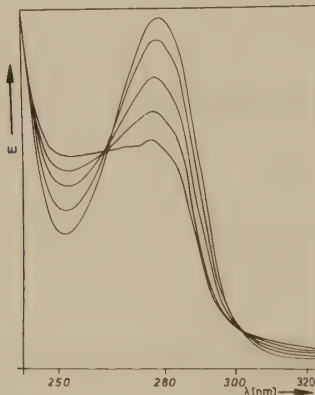


Abb. 29: Reaktion von NBS mit Papain in 8 M Harnstoff. Oxidation aller 5 Tryptophanreste (pH 4,0, 25°C).

Das Enzym wird durch die Modifizierung wesentlich instabiler, die Halbwertszeit der Inaktivierung bei Zimmertemperatur und pH 5,0 beträgt nur etwa 8 - 10 h.

In Tabelle 5 ist die Aktivität des modifizierten Enzyms gegen verschiedene Substrate enthalten.

Tab. 5: Enzymatische Aktivität des NBS-oxidierten Papains (mit drei oxidierten Tryptophanresten)

Substrat	Substrat- konzentra- tion [mM]	Aktivität in % einer nicht mod. Kontrolle	pH-Bereich	Be- merkung
Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid	3	250 $\pm$ 30	6 - 8	
Benzoyl-glycin-p-nitroanilid*	0,5	130 $\pm$ 25	6-7	Chromogene Substrate
p-Nitrophenylacetat**	0,5	150 $\pm$ 15	6-7	
Benzoyl-L-arginin-äthylester	80	40 $\pm$ 10	5,5-7,5	Estersubstrate
Benzoyl-DL-arginin-äthylester	80	40 $\pm$ 10	5,5-7,5	
Casein	1 mg/ml	30 $\pm$ 15	8,0	Proteinsubstrate
Protamin	5 mg/ml	30 $\pm$ 10	8,2	

* 20 % Dimethylformamid im Ansatz

** 1 % Aceton im Ansatz

} ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität

Ein auffallender Befund ist die fast um das 2 1/2-fache erhöhte Aktivität des modifizierten Enzyms gegenüber dem chromogenen Substrat D,L-BAPA, während das gleiche Enzym gegen BAEE (L-Isomeres und racemisches Gemisch) nur noch 40 % der Aktivität des nativen Enzyms besitzt. Ebenfalls stark verringert ist die Aktivität gegen makromolekulare Substrate.

3.9. Einzeluntersuchung mit anderen Modifizierungs- reagenzien

a) Diäthylpyrocarbonat

Dieses Reagenz, das nach Angaben von MÜHLRAD et al. [65] bei pH 6,0 sehr spezifisch nur mit Histidinresten von Proteinen reagieren soll, hatte auf die Aktivität (in Gegenwart und Abwesenheit von Harnstoff), auch bei Anwendung hoher Reagenzüberschüsse, keinen wesentlichen Einfluß.

b) Triäthylloxonium-Tetrafluoroborat

Die Reaktion des Enzyms mit diesem Reagenz führte zur fast vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Diesem Befund soll jedoch keine größere Bedeutung beigemessen werden, da das Reaktionsprodukt weitgehend unlöslich war.

Der Grad der Veresterung der Carboxylgruppen konnte außerdem nicht bestimmt werden.

4. DISKUSSION

4.1. Methodik

4.1.1. Analytische Probleme

Bestimmung des Modifizierungsgrades

Die überwiegende Mehrzahl der Gruppen-spezifischen Reagenzien, die in den letzten Jahren Eingang in die Proteinchemie gefunden haben, reagieren mit den verschiedenen Aminosäureresten meist zu Chromophoren, die im Sichtbaren oder im UV absorbieren. Die an niedermolekularen Modellverbindungen ermittelten Extinktionskoeffizienten dieser Chromophoren werden zur schnellen und bequemen Ermittlung der Zahl der erfaßbaren Reste herangezogen.

Gute Übereinstimmung zwischen der Zahl der durch Aminosäureanalyse ermittelten funktionellen Gruppen eines Proteins und den mit Modifizierungsreagenzien aus spektroskopischen Daten gewonnenen Ergebnissen konnten an denaturierten Proteinen demonstriert werden [41, 63, 72, 73]. Widersprüchliche Ergebnisse werden jedoch häufig erzielt bei Anwendung der Modifizierungsreagenzien auf die Bestimmung der Zahl der zugänglichen funktionellen Gruppen in einem nativen Protein und die Auswertung der Experimente einmal über spektroskopische Messungen und zum anderen durch Aminosäureanalyse [74, 75, 76, 77].

Einer der Gründe für auftretende Diskrepanzen ist darin zu suchen, daß einige Modifizierungsreagenzien zu mehr als einem Reaktionsprodukt führen und damit die spektroskopischen Daten verfälschen. So kann die Reaktion mit DHT zu zwei, die von HNBB zu drei Produkten mit verschiedenen Extinktionskoeffizienten mit ein und derselben Aminosäure führen. Im Falle der DHT-Kupplung von His- und Tyr-Resten wurde lange Zeit angenommen, daß größere Reagenzüberschüsse grundsätzlich zur Disubstitution der zugänglichen Reste führen [63] und der Berechnung des Modifizierungsgrades wurden einfach die Absorptionsmaxima der beiden Bisazokupplungsprodukte zugrundegelegt [62,63]. Jedoch selbst an dem relativ niedermolekularen Insulin konnte gezeigt werden, daß von 4 Tyrosinresten nur 3 zu Bisazokupplungsprodukten reagieren [78]. Ein Tyr-Rest läßt sich offensichtlich aus sterischen Gründen nur zum Monoazoderivat umsetzen. TAKENAKA et al. [78]. entwickelten deshalb ein Verfahren zur Bestimmung der drei Chromophoren Monoazo-, Bisazo-Tyrosin und Bisazohistidin durch Messung der Absorption bei zwei Wellenlängen (480/570 nm) und zwei pH-Werten (pH 8/10). Selbst nach Ansicht dieser Autoren ist hierbei vor allem die Bestimmung von Monoazotyrosin mit beträchtlichen Fehlermöglichkeiten verbunden. Die Bestimmung von Monoazohistidin ist gar nicht vorgesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch kombinierte Anwendung von Aminosäureanalyse und Spektralphotometrie die Konzentration aller 4 Chromophore bestimmt. Bei dieser Methode wird nur vorausgesetzt, daß die Extinktion der einzelnen Chromophore nicht durch eine besondere "Mikroumgebung" einzelner Reste wesentlich verfälscht wird.

Bestimmung des Tryptophans

Ein kritischer Punkt bei der Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung unbekannter Proteine ist die Bestimmung des Tryptophans. Da während der sauren Hydrolyse der Proteine Tryptophan normalerweise vollständig zerstört wird und auch eine vorsichtig durchgeführte alkalische Hydrolyse [79] meist bis zu 30 % Tryptophanverlust zur Folge hat, war die Entwicklung Tryptophan-spezifischer Reagenzien von besonderem Interesse. Breite Verwendung fanden deshalb N-Bromsuccinimid und 2-Hydroxy-5-nitro-benzylbromid (Koshland's Reagenz) zur Tryptophanbestimmung.

Wie schon erwähnt, führt dieses an sich hochspezifische Reagenz jedoch zu drei Reaktionsprodukten; besonders bei Proteinen mit Tryptophanresten stark differierender Reaktivitäten ist es daher meist nicht möglich, die Umsetzung der einzelnen Reste so zu lenken, daß eine Disubstitution erst dann stattfindet, wenn alle zugänglichen Tryptophanreste zu Monoprodukten reagiert

haben. Nicht nur im Falle von Papain konnte aufgrund dieses Sachverhaltes kein biphasischer Verlauf der Modifizierungsreaktion beobachtet werden [72].

Außerordentlich bewährt zur Bestimmung des Tryptophans hat sich in dieser Arbeit eine Modifizierung der von MATSUBARA und SASAKI [43] empfohlenen sauren Hydrolyse des Proteins in Gegenwart von Thioglykolsäure. (Über den Mechanismus der Schutzfunktion von Thioglykolsäure existieren noch keine Untersuchungen). Der Tryptophanverlust war unter diesen Bedingungen der Hydrolyse geringer als der Verlust, der bei den Aminosäuren Threonin, Serin und Methionin als normal angesehen wird.

Bestimmung von Tyrosin und Nitrotyrosin

Von einiger Bedeutung war für die vorliegenden Untersuchungen die unabhängige Bestimmung von Tyrosin und Nitrotyrosin in TiN-behandelten Enzympräparaten. Häufig wird bei der Verwendung dieses Reagenzes zu wenig auf die zahlreichen Störmöglichkeiten, die eine genaue Bestimmung des Modifizierungsgrades beeinträchtigen, geachtet: Atypische pK-Werte einzelner Nitro-Tyrosinreste [75], Quervernetzungsreaktionen und die Absorption von Nitrierungsprodukten des Tryptophans bei 381 nm, dem isostetischen Punkt der pH-Abhängigkeit der Nitrotyrosinalsorption, führten auch in dieser Arbeit zunächst

zu falschen Schlüssen über die Zahl modifizierbarer Tyrosinreste des Papains. BEAVEN und GRATZER [75] versuchten, einen Teil dieser Störmöglichkeiten zu vermeiden, indem sie den Nitrierungsgrad der Ribonuklease aus der Extinktionsdifferenz bei zwei pH-Werten (4,0 / 11,0) bei 440 nm ermittelten. Im Falle von Nitrosuccinyl-papainist jedoch unterhalb pH 5,1 die Löslichkeit so gering, daß eine genaue Extinktionsmessung kaum mehr möglich ist.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine spektrophotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mancher modifizierter Proteine bereitete ebenfalls Schwierigkeiten, wie unter 2.4.1. bereits angedeutet wurde. So versagt bei Proteinen höheren Modifizierungsgrades oft die sonst recht zuverlässige Mikrobiuret-Methode, da dann die Absorption des Kupferkomplexes sehr klein gegenüber der Absorption der Chromophore bei 330 nm ist. Azochromophore scheinen außerdem unter den Bedingungen der Mikrobiuret-Reaktion im stark Alkalischen langsamen irreversiblen Änderungen unterworfen zu sein, die zu ständig sich ändernden Meßwerten führen. Als einzig zuverlässige Methode kann nur eine Bestimmung aus der Aminosäureanalyse angesehen werden; nicht-modifizierbare aliphatische Reste vermitteln die genaue Konzentration.

4.1.2. Spezifität der Modifizierungsreagenzien

Modifizierungsreagenzien sollten nicht nur eine einfache Bestimmung der Zahl der von ihnen erfaßten Reste ermöglichen, sondern sie sollten möglichst spezifisch mit wenigen oder nur mit einer Aminosäure reagieren. Bei der Einführung neuer Reagenzien in die Proteinchemie wird die außerordentliche Spezifität des Reagenzes von den Autoren oft überbetont und Nebenreaktionen nicht oder nur am Rande erwähnt. Häufig wurde erst Jahre nachdem z.B. Reagenzien, wie Tetranitromethan [59], Diazo-tetrazol [62] etc. einen festen Platz in der Proteinchemie eingenommen hatten, auf beträchtliche Nebenreaktionen hingewiesen, die zu gravierenden Fehlschlüssen führen können [62, 63, 78]. Auf die TNM-induzierten Quervernetzungsreaktionen wurde schon hingewiesen.

Ein Überraschendes Ergebnis dieser Arbeit war die Reaktion von wenigstens 3 von 5 Tryptophanresten des Papains mit DHT selbst unter mildesten Bedingungen bei niedrigen Reagenzüberschüssen. Aus folgenden Gründen blieb die hohe Tryptophanreaktivität gegenüber DHT wahrscheinlich unentdeckt:

- 1) Das Absorptionsmaximum des Trp-Reaktionsproduktes (siehe Abb. 21) liegt in einem Bereich, in dem alle anderen Chromophore (einschließlich der Triazene) mehr oder weniger stark absorbieren.
- 2) Tryptophan wird in vielen Laboratorien noch nicht

routinemäßig in der Aminosäureanalyse bestimmt. Selbst die jetzt im Handel befindlichen Aminosäure-Testgemische ("für Proteinhydrolysate") enthalten kein Tryptophan.

Nur in älteren Arbeiten sind vage Hinweise auf die prinzipielle Möglichkeit der Kupplung von Diazoniumsalzen (nicht speziell DHT) mit Trp und Arg zu finden [69, 70].

Eine Reaktion von Arginin mit DHT konnte am Papain ausgeschlossen werden. In der Literatur wird auf die Nebenreaktionen von NBS und N-acetylimidazol [48, 50, 51, 103] etwas ausführlicher eingegangen; die Ergebnisse, die beim Papain an Tyrosin und Lysin erzielt wurden, sollen hier nicht wiederholt werden.

Für die Trinitroanilinderivate - die Reaktionsprodukte aus Trinitrobenzolsulfonsäure und primären Aminogruppen - werden in der Literatur [34, 47] Extinktionskoeffizienten von $0,91,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben. In dieser Arbeit wurden zur Standardisierung Verbindungen wie Alanin, Gly-Gly und ϵ -Aminocaprinsäure eingesetzt. Die Extinktionskoeffizienten bewegen sich um $1,35 \pm 0,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($1,9 \times 10^4$ in 50 % Äthanol/1 N HCl). Für die Anwendung der TNBS-Methode bei der Kinetik der Proteolyse ist diese Streuung ohne Bedeutung, da sich zahlreiche kleinere Extinktionsabweichungen der Trinitroanilinderivate von α -Aminogruppen ausgleichen; größere Fehlermöglichkeiten sind jedoch denkbar bei

der Reaktion von 10 individuellen ϵ -Aminogruppen der Lysinreste des Papains.

4.2. Funktion und Zustand der Aminosäuren

4.2.1. Reaktivität und Zustand der Lysinreste

Die Beobachtung, daß primär unter den in 2.6.2. genannten Reaktionsbedingungen zwischen 10 und 11 Aminogruppen der Succinylierungsreaktion zugänglich sind, läßt sich anhand des Molekülmodells des Enzyms verstehen: Alle Aminogruppen der 10 Lysinreste sowie die aminoendständige Aminogruppe liegen an der Oberfläche des Moleküls; unterschiedliche Reaktivitäten und Zugänglichkeit lassen sich trotzdem z.B. aufgrund der Teilnahme der Aminogruppen an H-Brücken (Lys 39) sowie elektrostatischen Wechselwirkungen mit Carboxylgruppen (Lys 17) sowie mehr oder weniger wirksamer Abschirmung erklären (Lys 174). Es ist auch in Betracht zu ziehen, daß die α -Aminogruppe des Isoleucins sich unter vergleichbaren Bedingungen bedeutend schlechter acylieren läßt als die ϵ -Aminogruppen des Lysins; das ist eine vielfach bestätigte Erfahrung der Peptidchemie [80]. In einer ausführlichen Untersuchung über Salzeffekte auf die Aktivität von Succinylpapain stellte SLUYTERMAN [81] fest, daß nur 8 Lysinreste succinylierbar sind. Dabei

ist zu berücksichtigen, daß bei seinen Untersuchungen die Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid in fester Form erfolgte. Da die Anhydridkristalle beim langsamen Auflösen rasch hydrolysieren, werden wesentlich niedrigere "Spitzenkonzentrationen" des Reagenzes erzielt, als bei Zugabe in Form von gesättigten acetonischen Lösungen. Die zusätzlich eingeführten 12 Succinylreste werden autokatalytisch wieder abgespalten. Da dieser Carboxylat-katalysierte Vorgang (Abb. 30) in einem Milieu niedriger Dielektrizitätskonstanten begünstigt ist, handelt es sich wahrscheinlich um Reste, die teilweise vom wässrigen Milieu abgeschirmt sind (z.B. Lys 174). Denkbar erscheint auch die Katalyse durch Papain-eigene Carboxylatgruppen. So besteht zwischen Lys 17 und einer Carboxylgruppe eine Salzbindung. Die Abspaltung durch die bereits in idealer Nachbarschaft befindliche Carboxylgruppe ist ebenfalls möglich.

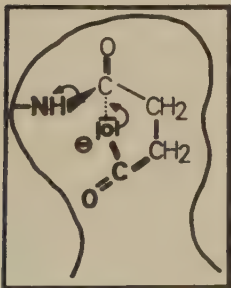


Abb. 30

4.2.2. Papain- und Succinylpapain-katalysierte Hydrolyse von Proteinsubstraten

Über die Kinetik proteolytischer Reaktionen liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Zu nennen sind die Arbeiten von GERTLER [82] und LIN et al. [34]. GERTLER verglich die Kinetik der Proteolyse durch Subtilisin und Elastase vor und nach deren Behandlung mit Maleinsäureanhydrid. Relative Michaelis-Menten-Parameter der vier Enzymspezies, unter anderem mit Casein als Substrat, bestimmte er mit dem Kunitz-Test (Freisetzung säurelöslicher Peptide). LIN et al. bestimmten wie in dieser Arbeit die Menge der entstandenen Aminogruppen. Beide Autoren verzichteten jedoch auf die Bestimmung von "Anfangsgeschwindigkeiten" der Freisetzung von Peptiden bzw. Aminogruppen: Die Proteolyse wurde bei allen Substratkonzentrationen nach immer gleichen Zeiten abgebrochen. Besonderer Wert wurde bei den vorliegenden Messungen zur Kinetik der Proteolyse durch Papain und Succinylpapain dagegen auf die Ermittlung von Anfangsgeschwindigkeiten gelegt.

Wie aus der Abbildung 2 a und 4 b hervorgeht, ist zwar die Freisetzung der Aminogruppen bei hohen Substratkonzentrationen eine - fast - lineare Funktion der Zeit, dies trifft jedoch im vorliegenden Fall für mittlere Substratkonzentrationen bereits nicht mehr zu. Nicht nur das Angebot gut spaltbarer Bindungen wird

ständig geringer, sondern auch eine Produkthemmung "besonderer Art" scheint den Fortgang der Proteolyse zu beeinträchtigen. Besonders deutlich geht dies aus einem Vergleich der Abbildungen 2 a mit 2 b hervor.: Die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse des positiv geladenen Substrates Protamin durch das negativ geladene Enzym Succinylpapain ist zwar im Vergleich zum positiven Papain um 50 % höher (bei hohen Substratkonzentrationen), jedoch stagniert die Proteolyse schon nach kurzer Zeit, während im Gegensatz dazu Papain erst nach Spaltung einer viel größeren Anzahl von Peptidbindungen "Produkthemmung" zeigt. Umgekehrt verhalten sich die beiden Enzyme bei der Hydrolyse des sauren Substrates Dimethylcasein - allerdings etwas weniger ausgeprägt. Vergleicht man diesen Befund wiederum mit den vier Michaelis-Konstanten der Systeme Papain/Protamin, Succinylpapain/Protamin einerseits und Papain/Dimethylcasein, Succinylpapain/Dimethylcasein andererseits (Tab. 3) so wird deutlich, daß dasjenige System mit der niedrigeren Michaelis-Konstanten auch eine wesentlich stärkere Produkthemmung aufweist (vgl. Abb. 2 und 4).

Folgende Schlüsse können daraus gezogen werden:

Entgegengesetzte Oberflächenladung von Enzym und Substrat fördert sowohl die Bindung des Substrates (wenn man annimmt, daß diese Michaelis-Konstanten überhaupt ein Maß für die Bindung sind), als auch die des Produktes (Produkthemmung).

So ist der vollständige Stillstand der Proteolyse im System Succinylpapain/Protamin leicht durch die große Zahl Arg- und Pro-haltiger Oligopeptide zu erklären, die unspezifisch an die Oberfläche gebunden werden. Es kann sich dabei nicht um eine "echte" Produkthemmung im aktiven Zentrum handeln, denn eine solche müßte bei Papain gleichfalls zu beobachten sein - wenn man davon ausgeht, daß die Succinylierung für das aktive Zentrum selbst keine Folgen hatte.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei dem System: positiv geladenes Papain/negativ geladenes Dimethylcasein, bei dem außerdem das Substrat ein wesentlich höheres Molekulargewicht als das Enzym besitzt. Hier hat die Hemmung des positiv geladenen Papains z.B. durch die Freisetzung und anschließende Bindung von negativ geladenen Phosphoserin-haltigen Oligopeptiden in der Anfangsphase eine etwas geringere Bedeutung. Die Vertauschung der Rollen von Papain und Succinylpapain kann deshalb nicht ganz so eindrucksvoll demonstriert werden. Dabei ist vor allem zu berücksichtigen, daß mit Dimethylcasein als Substrat wesentlich niedrigere Substratkonzentrationen angewendet werden als z.B. mit Protamin, da selbst bei 1 mg/ml schon Substrathemmungs-ähnliche Effekte auftreten (siehe Abb.4 c). LIN et al. berichten ebenfalls über eine "Substrathemmung" des Trypsins mit Casein als Substrat.

Sehr wahrscheinlich handelt es sich in beiden Fällen nicht

um einen solchen Hemmtyp. Die Ursache für die Abweichungen der DALZIEL-Graden vom linearen Verlauf ist darin zu suchen, daß die effektive, d.h. proteolytisch angreifbare Konzentration des Caseins mit steigender Caseinkonzentration abnimmt, vielleicht infolge Bildung größerer Molekülaggregate.

Etwas schwieriger zu beantworten ist die Frage, weshalb die katalytischen Konstanten des Succinylenzym im Vergleich zum nicht-modifizierten Enzym meist erhöht sind, mit Ausnahme des Systems Protamin/Succinylpapain, wo k_{cat} unverändert bleibt. Zunächst muß man sich darüber im Klaren sein, daß die vorliegenden Michaelis-Menten-Parameter äußerst komplexe Konstanten sind, die sich aus zahlreichen Einzel- K_m - und k_{cat} -Werten, aus Inhibitor-konstanten (Hemmung des Enzyms durch bestimmte Sequenzen), aus nicht-produktiven Bindungen etc. zusammensetzen und wahrscheinlich ist in K_m auch k_{cat} enthalten (im Sinne etwa der Briggs-Haldane-Kinetik). So ist auch k_{cat} sicher nicht nur ein quantitatives Maß für die Leistungsfähigkeit des katalytischen Zentrums in Bezug auf die Spaltung bestimmter Bindungen, sondern in k_{cat} kommt ebenfalls eine permanente Behinderung eines Teils der Enzymmoleküle durch das Substrat selbst (formal: nicht-kompetitiv) durch sehr starke elektrostatische Wechselwirkungen zum Ausdruck. Sehr einleuchtend scheint dies im Fall Papain/Dimethylcasein: zahlreiche Lys- und Arg-Reste an der Oberfläche des Enzyms und stark saure Phosphorsäuregruppen des Substrates schränken die freie Beweglichkeit und

Flexibilität des Enzyms stark ein. Succinylpapain wird dagegen zwar vom Substrat abgestoßen, aufgrund gleichsinniger Ladungen, was in der fast zehnmal höheren Michaelis-Konstanten seine Bestätigung findet. Dieser Effekt wird jedoch bei höheren Substratkonzentrationen durch den Vorteil einer ungehinderten Beweglichkeit weit überkompensiert.

Die Dimethylgelatine-Hydrolyse zeigt einige Charakteristika der Dimethylcasein-Hydrolyse, jedoch in etwas weniger ausgeprägter Form. Die sogar etwas kleinere K_m des Succinylpapains, bei etwas erhöhter k_{cat} im Vergleich zu Papain, läßt das fibrilläre Dimethylgelatine-Substrat eine Mittelstellung zwischen den anderen Substraten einnehmen.

Ohne Berücksichtigung von Molekulargewicht und Molekülstruktur läßt sich also vereinfacht sagen, daß große IEP-Unterschiede von Enzym und Substrat sowohl zu einer Erniedrigung der katalytischen Konstanten, als auch der Michaelis-Konstanten führen. Selbstverständlich spielen nicht nur IEP-Differenzen eine Rolle, sondern auch strukturelle Besonderheiten des Substrates wie bei Gelatine, die fibrilläre Raumnetze bildet [83]. Vielleicht können "Proteasenpaare" wie die vorliegenden, die sich nur in ihrer Ladung unterscheiden, zu einem vertieften Einblick in die Struktur von Makromolekülen in Lösung beitragen.

4.2.3. Funktion und Zustand des Histidins

In den letzten 6 - 7 Jahren, seit den entscheidenden Arbeiten von BERGER et al. [84] und LOWE et al. [24] und den röntgenographischen Untersuchungen von DREITH et al. [10, 12] wurde die Beteiligung des Histidinrestes 159 als kooperativer Partner des Cysteins an der Papainkatalyse als nahezu gesicherte Arbeitshypothese angesehen, die es im wesentlichen nur noch weiter zu bestätigen bzw. zu verfeinern galt. Die pH-Abhängigkeit der katalytischen Konstanten von Papain erforderte jedoch, wie schon erwähnt, für das Histidin entweder einen pK-Wert von 4 oder von 10. Direkte experimentelle Nachweise für solche extreme pK-Werte konnten jedoch nie geführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, mit Hilfe der Bisazotetrazolkupplung erstens die relative Zugänglichkeit der beiden Histidin-Reste zu ermitteln, zweitens, Aussagen über die Reaktivität des Histidinrestes im aktiven Zentrum zu machen und drittens, anhand der pH-Abhängigkeit der Kupplungsausbeute den pK-Wert des Histidins zu ermitteln.

Eine Reihe verschiedener Versuchsserien zeigte, daß zumindest bei Harnstoffabwesenheit nur einer der beiden vorhandenen Histidin-Reste unter schürferen Bedingungen gekuppelt werden konnte. Dieser Rest reagiert dabei nur zum Monoazoderivat. Histidin-Reste reagieren aber nor-

malerweise - noch wesentlich bereitwilliger als z.B. Tyrosinreste - zu Bisazokupplungsprodukten. Dieses Ergebnis fügt sich sehr gut ein in die röntgenographischen Ergebnisse: Wenn dieser Histidinrest überhaupt zur Kupplung mit Diazoniumsalzen befähigt sein sollte, ist eine Kupplung nur zum Monoazoderivat möglich, denn der Imidazolring wird beträchtlich vom Indolring des Trp-177 abgedeckt. Der wichtigste Befund ist jedoch die pH-Abhängigkeit der DHT-Kupplung: Der "pK"-Wert der Kupplungsausbeute liegt mit 6,2 - 6,6 eindeutig im Bereich einer als normal anzusehenden Histidindissoziation. Die in den bisherigen Reaktionsmechanismen geforderten anomalen pK-Werte konnten damit nicht bestätigt werden. Das Gegenargument, dieser pK-Wert entspräche dem des nicht-essentiellen His-81, läßt sich mit Hilfe eines wichtigen Befundes von POLGAR [85] entkräften. POLGAR beobachtete nämlich bei der Reaktion der stereoisomeren Alkylierungsmittel L- α -Brompropionamid und D- α -Brompropionamid im pH-Bereich um 7 eine Änderung des Verhältnisses der beiden Alkylierungsgeschwindigkeitskonstanten der SH-Gruppe und konnte damit überzeugend nachweisen, daß in diesem pH-Bereich kleinere strukturelle Änderungen im aktiven Zentrum stattfinden. In eben diesem pH-Bereich fällt in den vorliegenden Experimenten die Kupplungsausbeute des Histidins auch wieder stark ab. Das ermittelte Histidin pH-Profil entspricht damit sehr wahrscheinlich dem von His-159. Die Röntgenstrukturanalyse macht leider keine eindeutige Aussage darüber,

welcher der beiden Histidinreste als der "zugänglichere" bezeichnet werden kann.

Über die Ursache der starken Abnahme der Histidin-Kupplungsausbeute ab pH 7,2, die den Erfahrungen an niedermolekularen Modells-substanzen vollkommen zuwiderläuft [41] und die auch parallel zur Abnahme der Reaktivität einiger Tyrosinreste und sogar eines Lys-Restes verlaufen, können nur vage Vermutungen geäußert werden. Auffallend ist z.B., daß die Reaktionsbereitschaft eines Alkylierungsmittels, wie L- α -Jodpropionsäure ab pH 7,2 gleichfalls stark abnimmt, wie WALLENFELS et al. [86] fanden. Er machte dafür allerdings die Deprotonierung des Histidinrestes mit einem pK-Wert von 7,8 verantwortlich. Eine Deutung dieser Befunde soll in 4.3. gegeben werden.

4.2.4. Reaktionen des Tyrosins

Drei verschiedene Modifizierungsreagenzien wurden zur Untersuchung der Reaktivität und Zugänglichkeit der 19 Tyrosinreste verwendet: N-Acetyl-imidazol zur Acylierung der phenolischen OH-Gruppen, Tetranitromethan und Diazo-1H-Tetrazol zur elektrophilen Substitution der Kerne.

Acetylimidazol

Verschiedene Acylierungsexperimente ergaben, daß zumindest 12 Tyrosin-OH-Gruppen zugänglich sind. Dabei

unterscheiden sich die Ergebnisse in 8 M Harnstoff nur unwesentlich von denen, die in Harnstoffabwesenheit erzielt wurden.

1-H-Diazotetrazol

Die elektrophile Substitution am Ring mit DHT ergab jedoch, zumindest was die Gesamtzahl aller beim pH-Optimum modifizierbaren Reste anbetrifft, ein anderes Bild. So können in einem breiten pH-Bereich von 5 - 7 15 - 16 Tyrosine unter relativ milden Bedingungen umgesetzt werden. In einigen grundlegenden Untersuchungen [62, 63] über die optimale Anwendung des DHT-Reagenzes wird ein pH-Wert von 8,5 - 9,0 empfohlen; in dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, daß das pH-Optimum für Papain wesentlich tiefer liegt, nämlich bei pH 6,5. Das Maximum des Verhältnisses Bisazotyrosin zu Monoazotyrosin befindet sich gleichfalls in diesem pH-Bereich.

Tetranitromethan

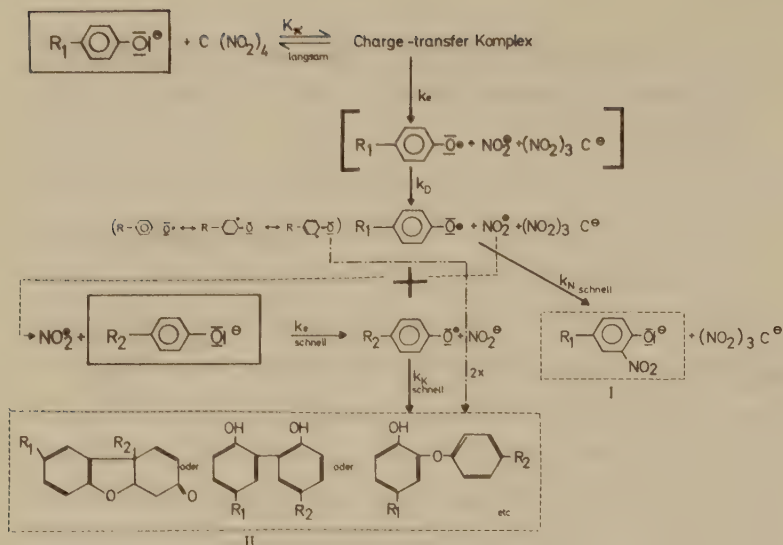
Die Reaktion von Papain mit TNM war zunächst in zweierlei Hinsicht interessant: 1. die Bildung eines vollkommen unlöslichen, offensichtlich quervernetzten Produktes, das selbst mit Harnstoff nicht in Lösung gebracht werden konnte. Dieses Verhalten scheint charakteristisch für globuläre Proteine mit hohem Dipolmoment, wie Papain, zu sein, denn DOYLE et al. [76] machten genau die gleichen Beobachtungen am γ -Globulin des Kaninchens.

2. Im Gegensatz dazu blieben die Löslichkeitseigenschaften des Succinylpapains nach Nitrierung unbeeinträchtigt.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen über TNM-Nebenreaktionen [71, 74, 76, 87] zeigten, daß 1. Quervernetzungen *n i c h t* grundsätzlich als Nebenreaktionen bei *a l l e n* Proteinen auftreten und 2. auch stärker quervernetzte Produkte sich in ihren Löslichkeitseigenschaften nicht unbedingt vom nativen Ausgangsmaterial unterscheiden müssen.

Wie aus Tabelle 4 und der Abbildung 28 zu entnehmen ist, unterliegt auch Succinylpapain beträchtlichen Quervernetzungen. Da Papain mit seinem hohen Tyrosingehalt (zum Teil sind Tyr-Reste sogar in der Sequenz benachbart) ein geradezu ideales Objekt zum Studium dieser Quervernetzungsreaktion ist, soll im folgenden ein (modifiziertes) Reaktionsschema vorgestellt werden, das sich auf umfangreiche Untersuchungen an para-substituierten Phenolen stützt. (BRUCE et al. [87]).

Nach Bildung eines charge-transfer-Komplexes aus TNM und dem Phenolat anion in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt findet der Transfer eines Elektrons vom Phenolat zum TNM statt, dem eine Spaltung der N-C-Bindung des TNM in einem ebenfalls langsamen Schritt folgt. Nach diesem Auftakt laufen eine Reihe schneller radikalischer Reaktionen ab, die sowohl zu Nitrotyrosinderivaten (I), als auch zu Biphenolen (II) führen können.



Dem Reaktionsschema ist zu entnehmen, daß eine Erhöhung des pH-Wertes (die gleichbedeutend ist mit einer Erhöhung der Phenolatanionkonzentration) zu einer Steigerung der Kupplungsreaktion (II) auf Kosten der Nitrierungsreaktion (I) führt, wenn man annimmt, daß die Konstanten k_K und k_e größer sind als k_N , d.h. wenn die Bereitschaft des $\text{NO}_2^\bullet$ -Radikals mit dem Phenoxid-Radikal zu kombinieren kleiner ist als die Tendenz, einem bereitstehenden Phenolatanion ein Elektron zu entreißen unter Bildung von Nitrit.

Die pH-Abhängigkeit des Verhältnisses Vernetzungsgrad/Nitrierungsgrad beim Succinylpapain stützen das Reaktionsschema von BRUCE et al. [87].

In einer Untersuchung über dieses Verhältnis an verschiedenen vorbehandelten Ovotransferrin-Präparaten (nativ; denaturiert; reduziert und aminoäthyliert; Eisen-gesättigt) kommen WILLIAMS und LOWE [71] zu dem Schluß, daß nitrierbare, also gut zugängliche Tyr-Reste, die nur eine geringe Tendenz zu Kupplungsreaktionen zeigen, ganz besondere Positionen im (oder am) Proteinmolekül einnehmen müssen.

Die vorliegenden Daten des Succinylpapains lassen sich z.Zt. nicht zu vergleichbaren Studien an anderen Proteinen in Beziehung setzen, da die pH-Abhängigkeit der Vernetzung an anderen Proteinen bisher nicht untersucht wurde. Nur ein Vergleich mit gut charakterisierten Proteinen kann eventuell den Informationsgehalt solcher Untersuchungen aufzeigen.

Die Resultate der drei Reaktionen am Succinylpapain stehen zum Teil in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse [12]: 3 oder 4 Tyr-Reste sind im Inneren des Proteins lokalisiert (zu Tyr 87 ist keine eindeutige Aussage möglich), bei 5 Tyrosinresten im Oberflächenbereich wird die Beteiligung an H-Brückenbindungen wahrscheinlich gemacht, 10 - 11 Reste befinden sich ebenfalls an der Oberfläche, ohne daß röntgeno-

graphisch Wechselwirkungen mit anderen Resten erkennbar sind. Zieht man die Ergebnisse der DHT-Kupplung heran, so ist es naheliegend, die Bisazokupplung dieser 10 Reste anzunehmen (Abb. 17), dagegen die 5 Monoazotyrosinreste den weniger gut zugänglichen, an einer H-Brücke beteiligten, Tyr-Resten zuzuordnen. Dafür spricht, daß nur etwa 12 - 13 Tyr-Reste acylierbar sind, die Differenz zur Zahl aller kuppelnden Reste beträgt also 4. Es ist einleuchtend, daß wahrscheinlich die überwiegende Mehrzahl der an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten OH-Gruppen nicht acetylierbar ist. Zwanglos fügt sich hier auch die Zahl der Tyrosinreste ein, die trotz vorheriger Behandlung des Enzyms mit N-Acetylimidazol noch zu Monoazoderivaten kuppeln: Bei pH-Werten über 8 werden gleichfalls 3 - 4 gefunden.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse mit denen der Reaktion Papain/TNM ist nur mit Einschränkung möglich. So sind MYERS und GLAZER [88] aufgrund von Untersuchungen an Subtilisin der Ansicht, daß TNM wegen seines außerordentlich hydrophoben Charakters mit Tyrosin-Resten in apolaren Bezirken des Proteins sogar bevorzugt reagieren kann.

4.2.5. Die Rolle des Tryptophans

In den letzten Jahren wurden mehrere Arbeiten publiziert, in denen eine Beteiligung eines Tryptophanrestes an der Papain-Katalyse angenommen wurde, vor allem aufgrund der Ergebnisse von Modifizierungsexperimenten mit mehr oder weniger Trp-spezifischen Reagenzien. In keinem Fall brachten die Experimente jedoch Klarheit über die Funktion eines Tryptophanrestes bei der Katalyse oder über seine Beziehung zu anderen funktionellen Gruppen. So ist trotz zusätzlicher röntgenographischer Informationen immer noch nicht klar, ob Modifizierung von Trp-26, Trp-69 oder Trp-177 für einige auffallende Änderungen der kinetischen Parameter des Enzyms verantwortlich zu machen waren [89, 90, 91, 92, 93].

MORIHARA und NAGAMI [90] wiesen zum ersten Male auf die Rolle eines Trp-Restes bei der Katalyse hin, gestützt auf den Effekt einer Nitrierung des Enzyms mit einem nur 1,8 fachen TNM-Überschuß. Ein äußerst reaktiver Tryptophanrest soll unter diesen milden Bedingungen zum 7-Nitroderivat umgesetzt worden sein, wie die Autoren anhand von Untersuchungen an niedermolekularen Modellen herleiten. Sie stellten dabei einen vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms fest, der jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. MORIHARA und NAGAMI verwendeten bei ihren Untersuchungen allerdings aktiviertes Papain und gingen dabei von der Annahme aus, daß die

mögliche Oxidation der essentiellen SH-Gruppe im ungünstigsten Fall zu einem - leicht wieder reduzierbaren - Disulfid führt. In einer Untersuchung über die Reaktion von Tetranitromethan mit SH-Gruppen in Proteinen, wiesen jedoch SOKOLOVSKI et al. [94] nach, daß auch eine quantitative Oxidation zur nicht reduzierbaren Sulfin- oder Sulfonsäure möglich ist. Die von MORIHARA und NAGAMI beobachtete Inaktivierung des Papains war also die Folge der Oxidation der essentiellen SH-Gruppe des Enzyms. In der vorliegenden Arbeit konnte am Sulfonyl-thiosulfatderivat des Succinylpapains nachgewiesen werden, daß zwar ein Tyrosinrest sehr leicht mit TNM reagiert, sein Anteil an dem teilweisen Aktivitätsverlust dürfte im Hinblick auf die gleichzeitig eintretenden Vernetzungen sehr gering sein.

NBS-Oxidation und Keshland's Reagenz

Über die NBS-Oxidation des Papains und der Aktivität des resultierenden Produktes bestanden bisher beträchtliche Meinungsverschiedenheiten. So stellten SUN und TSOU [95] einen Aktivitätsverlust fest, ebenso wie PEREZ-VILLASENOR und TORRE-BLANCO [96] am Mercuripapain, während KIRSCHENBAUM [89] eine fast 300 %ige Aktivitätssteigerung registrierte. Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ergaben, daß die Diskrepanz einfach in der Verwendung verschiedener Substrate durch die Autoren begründet ist. So zeigt ein und das gleiche an drei Tryptophanresten

oxidiertes Papain gegenüber dem chromogenen Substrat D,L-BAPA die sehr große Aktivitätszunahme, die KIRSCHENBAUM beschrieben hatte, während Ester-, Amid- und Protein-substrate wesentlich schlechter als von der nicht oxidierten nativen Kontrolle umgesetzt werden.

Ganz ähnliche Ergebnisse werden nach der Reaktion des Enzyms mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid erzielt. Eine beträchtliche Aktivitätssteigerung gegenüber dem chromogenen Substrat zeigte allerdings nur ein kleiner Bruchteil des modifizierten Enzyms, der mit affinitätschromatographischen Mitteln isoliert werden konnte. Eine wesentlich elegantere Methode zur spezifischen Hydroxynitrobenzylung nur eines Trp-Restes im aktiven Zentrum wurde von MOLE und HORTON [92, 93] während der Fertigstellung dieser Arbeit publiziert: Mit Hilfe des Pseudosubstrates N-Carbobenzoxy-glycin-(2-chlormethyl-4-nitro)-phenylester konnten sie eine Hydroxynitrobenzylgruppierung in das aktive Zentrum einführen. Aus der Arbeit, in der die Aktivitätssteigerung gegenüber chromogenen Substraten bestätigt wurde, geht jedoch ebenfalls nicht hervor, welcher Tryptophanrest für die aufgezeigten Effekte verantwortlich zu machen ist.

Die meisten Informationen über das Tryptophan haben zu unserer Überraschung DHT-Kupplungsexperimente erbracht. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, kuppeln bei pH 5 alle 5 Tryptophanreste, wie in der Aminosäureanalyse eindeutig festgestellt werden konnte. Obwohl die Struktur

des Kupplungsproduktes noch nicht entgültig ermittelt werden konnte, steht doch fest, daß es sich um ein Monoazoprodukt handelt. Für die Interpretation der Kupplungsexperimente mit DHT ist vor allem der Befund wichtig, daß oberhalb pH 7 nur noch 4 Tryptophanreste kuppeln. Dieser Befund gewinnt im Zusammenhang mit der HNBB- und NBS-Reaktion und den Ergebnissen der Photooxidation in der Literatur an Bedeutung [91]:

1. Das DHT-behandelte Enzym zeigt nur dann eine beträchtliche Restaktivität, wenn von 5 Tryptophan-Resten einer nicht gekuppelt wird. Dies ist oberhalb pH 7,0 der Fall. Entweder ist die Integrität dieses Restes unbedingt erforderlich oder die Azotetrazolgruppierung dieses Restes ragt direkt ins aktive Zentrum.
2. Dieser eine Rest ist oberhalb pH 7 kein reaktiver Rest. So können 2 - 3 Tryptophane bei niedrigen Reagenzüberschüssen gekuppelt werden, ohne daß eine nennenswerte Aktivitätsminderung zu beobachten ist.
3. Auch die Nitrierung eines reaktiven Tryptophans bei pH 8,0 hat keinen entscheidenden Einfluß auf die katalytischen Eigenschaften.
4. Im Gegensatz dazu wird bei pH 4 in Gegenwart kleiner Reagenzüberschüsse (Hydroxynitrobenzylisierung, NBS-Oxidation) eine deutliche Änderung kinetischer Parameter erzielt.
5. JORI und GALIAZZO [91] weisen in ihrer Arbeit über die photochemische Oxidation der einzelnen Trypto-

phanreste darauf hin, daß in der Beurteilung des Zustandes von Trp-177 krasse Diskrepanzen zwischen photochemischer Oxidierbarkeit und röntgenographischen Daten bestehen: Die letzteren weisen den Rest als den quasi exponiertesten von allen Trp-Resten aus. JORI und GALIAZZO [91] konnten jedoch zeigen, daß die Oxidation dieses Restes zum Formyl-kynurenin einen praktisch vollständigen Verlust der katalytischen Eigenschaften zur Folge hat. Die Bedingungen, unter denen eine Oxidation dieses Restes nur erreicht werden konnte, veranlassen die Autoren zu dem Schluß, daß Trp-177 im Gegensatz zu den Aussagen der Röntgenstrukturanalyse weitgehend im Inneren des Protein-gerüsts vergraben sein muß.

Möglich ist, daß dieser Trp-Rest einer sehr starken Aromatenwechselwirkung mit dem Histidin-159 unterliegt, das selbst eine, durch den Tryptophanrest ebenfalls abgeschirmte, Wasserstoffbrücke zu Asp-175 ausbildet. Röntgenstrukturanalyse [12] und fluorometrische Untersuchungen [97, 98, 99] deuten gleichfalls in diese Richtung.

Denkbar wäre folgende Interpretation: Eine DHT-Kupplung eben dieses Trp-Restes ist nur möglich, solange der Histidinrest protoniert ist, d.h. in der Abnahme der Kupplungsausbeute des Tryptophanrestes ab pH 6,5 spiegelt sich die Deprotonierung des Histidinrestes wieder.

4.2.6. Bedeutung der Carboxylgruppen für die katalytische Aktivität

In der Einleitung dieser Arbeit wurde erläutert, welche experimentellen Befunde dazu führten, im Modell des aktiven Zentrums statt einer Carboxylgruppe als kooperativem Partner der essentiellen SH-Gruppe einem Imidazolrest den Vorzug zu geben. Es wurden jedoch bisher keine Versuche unternommen, mit Hilfe chemischer Reaktionen die Rolle der Carboxylgruppen des Enzyms zu klären. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nach Modifizierung von 1,6 Carboxylgruppen von insgesamt 13 eine vollständige Inaktivierung erreicht werden kann. Dieses Ergebnis wurde zudem, wie schon ausgeführt, in 5 M Harnstoff erzielt, also unter Bedingungen, die durchaus zu einer Verminderung der ursprünglichen Reaktivität führen können. Der Informationsgehalt dieses Befundes liegt weniger darin, daß überhaupt eine Inaktivierung durch Carboxylmodifizierung erzielt werden konnte (rein sterische Hemmungen der Katalyse aufgrund der unbestrittenen Nähe einer Carboxylgruppe zur essentiellen SH-Gruppe wären in jedem Fall zu erwarten gewesen), vielmehr darin, daß diese Carboxylgruppe gegenüber den 12 anderen bei weitem bevorzugt mit Carbodiimid reagiert. Manche Autoren (6, 12) übertragen dieser Carboxylgruppe die Aufgabe, durch elektrostatische Abstoßung für eine möglichst rasche Entfernung der Pro-

dukte der enzymatischen Reaktion zu sorgen, oder sie machen sie für die Bevorzugung von basischen Substraten durch Papain verantwortlich [22]. Dagegen spricht einmal, daß für ausschließlich elektrostatische Funktionen kaum eine erhöhte Reaktivität erforderlich ist, zum anderen konnte gezeigt werden, daß der Verlauf der Inaktivierung mit neutralen (BGEE) und basischen Substraten (D,L-BAPA) der gleiche ist.

4.3. Zusammenfassung und Deutung für das aktive Zentrum relevanter Befunde. Vorschlag für den Mechanismus der Papainkatalyse

Oberhalb pH 6,5 reagiert ein Tryptophanrest von fünf Resten nicht mehr mit DHT und im gleichen Maße wie die Kupplungsausbeute dieses einen Restes mit steigendem pH abnimmt, nehmen die Kupplungsausbeuten einiger Tyrosin-, eines Lysin- und eines Histidin-Restes gleichfalls ab, im Gegensatz zu den Beobachtungen an niedermolekularen Modellen.

Dabei zeichnet sich besonders die Reaktion eines Histidinrestes zum M O N O-azoderivat durch ein enges pH-Optimum aus (siehe Abb. 16 und 17). Diese Befunde werden so gedeutet: Der saure Ast dieser pH-Abhängigkeit entspricht der normalen Dissoziation des Imidazoliumions. Seine Deprotonierung beeinflusst gleichermaßen die

Stärke der H-Brücken-Bindung zu Asparagin-175 [29], als auch die Intensität der Aromatenwechselwirkung mit Tryptophan-177 und zwar in einer Weise, die zur weiteren Abnahme der Reaktionsbereitschaft b e i d e r Heteroaromaten mit DHT führt. (Über die Natur dieser Wechselwirkungen können z.Zt. keine konkreten Angaben gemacht werden, sie ist wahrscheinlich nicht vom charge-transfer Typ).

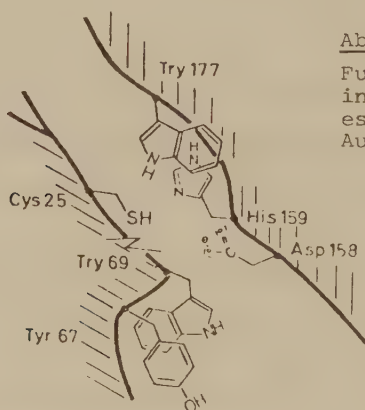
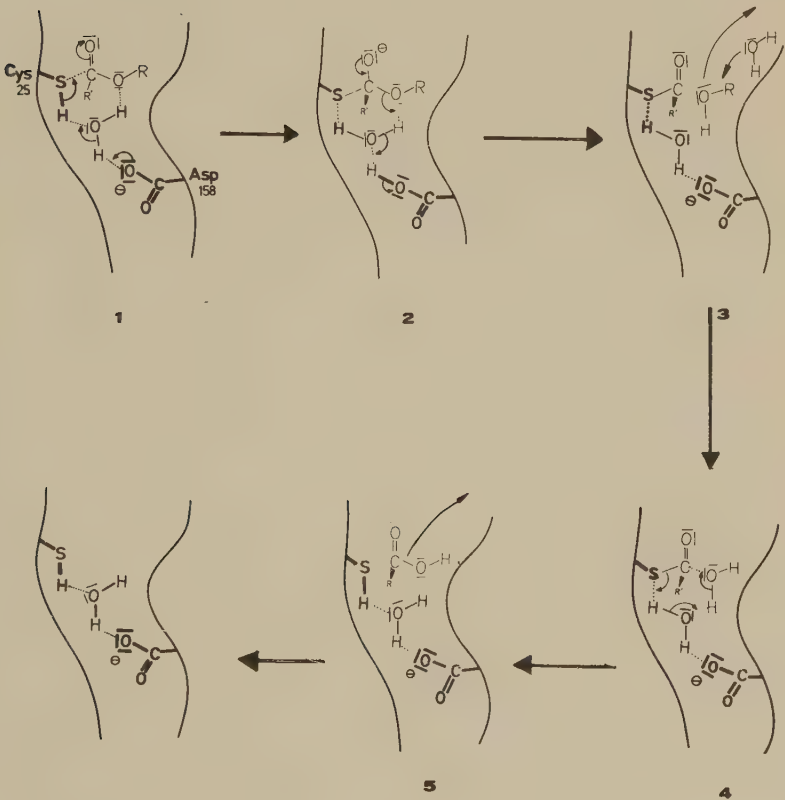


Abb. 31:

Funktionelle Gruppen
in der Nähe der
essentiellen SH-Gruppe.
Aus: [100].

Die Annahme liegt nahe, daß Tryptophan-177 und Histidin-159 (mit Asparagin-175) für die Geometrie des aktiven Zentrums verantwortlich sind (Abb. 31). Die Kupplung eines der beiden Heteroaromaten führt danach zu einer Änderung der Tertiärstruktur, die sich dadurch zu erkennen gibt, daß einige Reste, 4 Tyrosinreste und 1 Lysinrest, entweder in eine exponiertere Lage geraten oder eine teilweise Lösung derjenigen Wasserstoffbrücken eintritt, an denen sie beteiligt sind.

Die wichtigere Aufgabe von Histidin-159 und Tryptophan-177 könnte darin bestehen, zwischen Asparaginsäure-158 und Cystein-25 wenige Wassermoleküle in einem hochgeordneten Zustand zu halten. Danach könnte man folgenden Ablauf der enzymatischen Reaktion formulieren:



Die katalytische Reaktion wird eingeleitet mit dem nukleophilen Angriff der SH-Gruppe am Carbonyl-Kohlenstoffatom des (Ester-) Substrates, unterstützt durch die Carboxylat-Base (1). Dabei vermitteln ein oder mehrere Wassermoleküle den Protonen-Transfer von der SH-Gruppe zur Base (2). Der Zerfall des tetraedrischen Intermediärproduktes zum Acylenzym erfolgt Säure-katalysiert (3). Nachdem die Alkoholkomponente durch Wasser ersetzt worden ist (4), wird - wieder mit Unterstützung der Carboxylat-Base - das Acylenzym gespalten (4, 5). Dieser Vorgang kann auch analog zum Schritt $1 \rightarrow 2$ wieder über ein tetraedrisches Zwischenprodukt formuliert werden: Zunächst würde dann Wasser nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff angreifen, unterstützt durch die Carboxylat-Base, die vom Wasser simultan ein Proton übernimmt; dieser Ablauf ist spiegelbildlich zu einer, durch Kohlenstoff- und Sauerstoffatom der Carbonylfunktion zu legenden Symmetrieachse; die Rolle der Thiofunktion in Schritt $1 \rightarrow 2$ übernimmt jetzt das Wasser.

Umgekehrt kann die Schrittfolge $1 \rightarrow 3$ genau wie die Schrittfolge $4 \rightarrow 5$ formuliert werden.

In diesem Zusammenhang ist es auch unerheblich, ob ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet wird oder nicht, d.h. ob die Base für eine sehr kurze Zeitspanne ein Proton wirklich übernimmt oder ob sie lediglich mit dafür sorgt, die Thiofunktion, das Substrat und die

Wassermoleküle in einer optimalen Anordnung zu halten, verbunden mit einer Polarisierung der bindenden Orbitale in der gewünschten Richtung. Vielleicht kann man noch einen Schritt weitergehen und ein noch "abstrakteres" Modell entwerfen, in dem wiederum unerheblich ist, ob ein Acylenzym entsteht oder ob "auf dem Wege dorthin", z.B. bei der Katalyse der Amidspaltung, bereits Produktbildung einsetzt. So ließe sich vielleicht auch der Streit, ob grundsätzlich mit allen Substraten ein Acylenzym gebildet wird, beilegen. Fortschritte in der Quantenbiochemie werden sicher eines Tages zu einem vertieften Verständnis dieser Vorgänge beitragen.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen erschienen zwei Arbeiten einer japanischen und einer amerikanischen Arbeitsgruppe, in denen zum ersten Mal, experimentell belegt, ebenfalls Zweifel am bisherigen Imidazol-SH-Konzept geäußert wurden.

So fanden MURACHI und OKUMURA [101] mit Hilfe photochemischer Methoden und LEWIS und SHAFFER [102] durch "Umgebungs-sensitive" Chromophore im aktiven Zentrum, daß Histidin-159 sehr wahrscheinlich keinen atypischen pK-Wert besitzt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen der chemischen Modifizierung der Carboxylgruppen, des Lysins, des Histidins, Tyrosins, Tryptophans und der katalytischen Aktivität sowie den kinetischen Eigenschaften des Papains führten zu folgenden Erkenntnissen über Funktion und Zustand dieser Aminosäuren im Enzym:

1. Kinetische Studien der Reaktion des Papains mit Bernsteinsäureanhydrid zeigen, daß zehn Aminogruppen succinylierbar sind ; zwei Succinylreste werden leicht wieder abgespalten, und man erhält ein stabiles Succinylpapain mit drei freien Aminogruppen, von denen eine vom aminoendständigen Isoleucin stammt. Die Löslichkeit dieses modifizierten Papains ist in Abhängigkeit vom pH und der Ionenstärke gegenüber Papain auf mehr als das zehnfache erhöht, bei etwas verminderter Temperaturstabilität.
2. Die Bedeutung der Oberflächenladung von Papain und Succinylpapain für die Bindung makromolekularer Substrate wurde mit stark sauren (Dimethylcasein), stark basischen (Protamin) und fibrillären (Dimethylgelatine) Substraten untersucht. Durch Messung echter Proteolyse-Anfangsgeschwindigkeiten konnten Michaelis-Menten-Parameter für diese Substrate be-

stimmt werden und daraus Schlüsse über die Wechselwirkung des Enzyms mit makromolekularen Substraten gezogen werden.

3. Von zweieim Molekül vorhandenen Histidinresten kann einer mit 5-Diazo-1-H-tetrazol zu einem Monoazoderivat gekuppelt werden. Die pH-Abhängigkeit der Kupplungsreaktion läßt einen normalen pK-Wert des Histidins erkennen; das parallel gemessene pH-Aktivitätsprofil sowie die Röntgenstrukturanalyse zeigen, daß es sich dabei um das Histidin des aktiven Zentrums handeln muß.
4. Modifizierungsreaktionen an den fünf im Enzym vorhandenen Tryptophanresten mit N-Bromsuccinimid, 2-Hydroxy-4-nitrobenzylbromid (Kosland's Reagenz) sowie den nicht für Tryptophan spezifischen Reagenzien Tetranitromethan und 5-Diazo-1-H-tetrazol lassen folgende Schlüsse zu:

Oxidation von drei Tryptophanresten durch NBS bei pH 4 führt zu einer 300 %igen Erhöhung der Enzymaktivität mit Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid, während die Aktivität gegenüber allen anderen untersuchten Substraten auf 30 - 40 % abfällt.

Reaktion des Enzyms mit Koshland-Reagenz bei pH 3,6 führt zur Modifizierung von drei Tryptophanresten. Auftrennung des Reaktionsgemisches an einer Affinitätssäule liefert ein Enzym, das ebenfalls eine er-

höhte Aktivität zeigt.

Alle fünf Tryptophanreste reagieren mit 5-Diazo-1-H-tetrazol unter völligem Verlust der Aktivität; oberhalb pH 7 reagieren vier Reste, wobei nur eine Verminderung der Aktivität eintritt. Bei Kupplung von zwei Resten tritt kein Aktivitätsverlust auf. Die Auswirkungen der Kupplung des in unmittelbarer Nähe eines Histidins befindlichen Tryptophanrestes auf die Aktivität des Enzyms stehen in engem Zusammenhang mit der gleichzeitig erfolgenden Kupplung dieses Histidins zum Monoazoderivat.

5. Modifizierungsreaktionen an den 19 im Molekül vorhandenen Tyrosinen mit Tetranitromethan, 5-Diazo-1-H-tetrazol und Acetylimidazol lassen drei Gruppen von Tyrosinresten unterschiedlicher Reaktivität erkennen: Etwa 10 - 11 Reste sind gut zugänglich, 4 - 5 nur bei Verschärfung der Reaktionsbedingungen und weitere 3-4 erst nach längeren Reaktionszeiten (2 Stunden) und hohen Reagenzüberschüssen. Beziehungen zwischen Modifizierungsgrad und Aktivität sind hier nicht herzustellen, da Tryptophan und Histidin bei Verwendung dieser Reagenzien ebenfalls betroffen sind. Zwischen den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse und den Modifizierungsexperimenten treten Diskrepanzen im Hinblick auf die Zahl der reaktiven und zugänglichen Tyrosinreste auf.

Aufgrund seines hohen Tyrosin Gehaltes und seiner günstigen Löslichkeitseigenschaften wurde Succinyl-papain zu einer eingehenden Studie über Tetranitromethan induzierte Vernetzungsreaktionen am Tyrosin herangezogen.

6. Untersuchungen zur Funktion der Carboxylgruppen des Papains mit Hilfe eines Nukleophils (Glycinäthylester) und Carbodiimid führten zu dem Ergebnis, daß durch Blockierung einer Carboxylgruppe das Enzym inaktiviert wird.
7. Aus den vorliegenden Befunden wurde ein Mechanismus der Papain-Katalyse hergeleitet, in dem neben der essentiellen SH-Gruppe des Enzyms einer Carboxylgruppe eine entscheidende Funktion zukommt.
8. Die Spezifität der üblichen Modifizierungsreagenzien und die Methoden zur Bestimmung des Modifizierungsgrades wurden einer kritischen Analyse unterzogen; dabei wird die außerordentliche Reaktivität von 5-Piano-1-H-tetrazol zu Tryptophan im erstenmal genauer studiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Kimmel, J.R. und Schmith, E.L.
J. Biol. Chem. 207, 515-531 (1954)
- [2] Kimmel, J.R. und Smith, E.L.
in: Advances in Enzymology (Nord, F.F. Hrsg.)
Bd. 19. S. 267-334 (1957)
- [3] Smith, E.L. und Kimmel, J.R.
in: The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K.
Hrsg.) Bd. 4, S. 133-174, Academic Press, New-
York, London (1960)
- [4] Cunningham, L.
in: Comprehensive Biochemistry Bd. 16 S. 140-151
(M. Florkin und E.H. Stotz, Hrsg.)
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London,
New York (1965)
- [5] Arnon, R.
in: Methods in Enzymology (Perlmann, G.E. und
Lorand, L. Hrsg.) Bd. 19, S. 226-244, Academic
Press, New York und London (1970)
- [6] Glazer, A.N. und Smith E.L.
in: The Enzymes (Boyer, P.D., Hrsg.) Bd. 3,
III Auflage, S. 502-546 (1971)
- [7] Smith, E.L., Kimmel, J.R. und Brown, D.M.
J. Biol. Chem. 207, 533-561 (1954)
- [8] Light, A. Frater, R., Kimmel, J.R. und Smith, E.L.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1276-1283 (1964)
- [9] Husain, S.S. und Lowe, G.
Biochem. J. 114, 279-283 (1969)
- [10] Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M.
und Wolthers, B.G.
Nature 216, 929-932 (1968)

- [11] Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R. und Wolthers, B.G.
in: The Enzymes (Boyer, P.D., Hrsg.) Bd. 3
III Auflagen, S. 484-499 (1971)
- [12] Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R. und Wolthers, B.G.
Adv. Protein Chem. 25, 79-115 (1971)
- [13] Drenth, J., Jansonius, R., Koekoek, R., Sluyterman, L.A.AE. und Wolthers, B.G.
Phil. Trans. Roy. Soc. London B 257, 231-236 (1970)
- [14] Blumberg, S., Schechter, I. und Berger, A.
Eur. J. Biochem. 15, 97-102 (1970)
- [15] Balls, A.K. und Lineweaver, H.
J. Biol. Chem. 130, 669-674 (1939)
- [16] Balls, A.K., Thomson, R.R. und Jones, W.W.
Ind. Eng. Chem. 32, 1144-1147 (1940)
- [17] Klein, I.B. und Kirsch, J.F.
J. Biol. Chem. 244, 5928-5935 (1969)
- [18] Schneider, F.
Z. Physiol. Chem. 348, 1034-1042 (1967)
- [19] Schneider, F., Schaich, E., Wenck, H.
Z. Physiol. Chem. 349, 1525-1528 (1968)
- [20] Kail, M., Schneider, F., Wenck, H.
Z. Physiol. Chem. 351, 1280-1282 (1970)
- [21] Löffler, H.G., Schneider, F. und Wenck, H.
Z. Naturforsch. 26 b, 43-46 (1971)
- [22] Stockell, A. und Smith, E.L.
J. Biol. Chem. 227, 1-26 (1957)
- [23] Smith, E.L.
J. Biol. Chem. 233, 1392-1397 (1958)
- [24] Lowe, G.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 257, 237-248 (1970)

- [25] Lowe, G. und Williams, A.
Biochem. J. 96, 189-193 (1965)
- [26] Lowe, G. und Williams, A.
Biochem. J. 96, 194-198 (1965)
- [27] Husain, S.S. und Lowe, G.
Biochem. J. 108, 855-859 (1968)
- [28] Lucas, E.C. und Williams, A.
Biochemistry 8, 5125-5135 (1969)
- [29] Husain, S.S. und Lowe, G.
Biochem. J. 116, 689-692 (1970)
- [30] Bloemendal, H.
zitiert in: Maurer, H.R., Diskelektrophorese
S. 30-36, de Gruyter, Berlin (1968)
- [31] Schwert, G.W., Neurath, H., Kaufmann, S. und
Snoke, J.F.
J. Biol. Chem. 172, 221-239 (1948)
- [32] Sluyterman, L.A. AE.
Biochim. Biophys. Acta 85, 305-315 (1964)
- [33] Lowe, G. und Yuthavong, Y.
Biochem. J. 124, 107-115 (1971)
- [34] Lin, Y., Means, G.E. und Feeney, R.D.
J. Biol. Chem. 244, 789-793 (1969)
- [35] Salkowski
Berichte der deutschen chem. Gesellsch. 22, 2142-2147
(1889)
- [36] Stödel, G.
Liebigs Annalen 116, 77-82 (1860)
- [37] Glazer, A.N. und Smith, E.L.
J. Biol. Chem. 236, 2948-2950 (1961)
- [38] Bailey, J.L.
Techniques in Protein Chemistry, Elsevier, Amsterdam,
London, New York (1967)

- [39] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- [40] Maurer, H.R.
Disk-Elektrophorese S. 42-43, de Gruyter, Berlin (1968)
- [41] Means, G.E. und Feeney, R.E.
Chemical Modification of Proteins,
Holden-Day, Inc. San Francisco (1971)
- [42] Jirgensons, B.
Biochim.Biophys. Acta 200, 9-17 (1970)
- [43] Matsubara, H. und Sasaki, R.M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175-178 (1969)
- [44] Moore, S. und Stein, W.H.
in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. und Kaplan, N.O., Hrsg.) Bd. 6, S. 819-831, Academic Press, New York
- [45] Handbuch zum Aminosäureanalysator "Unichrom"
Beckman Instruments München
- [46] Röhm, K.H.
Dissertation, Marburg (1972)
- [47] Habeeb, A.F.S.A.
Anal. Biochem. 14, 328-336 (1966)
- [48] Riordan, J.F. und Vallee, B.L.
in: Methods in Enzymology (Hirs, C.W.H. und Timasheff, S.N., Hrsg.) Bd. 25, Seite 500-506 (1972)
- [49] Simpson, R.T., Riordan, J.F. und Vallee, B.L.
Biochemistry 2, 616-622 (1963)
- [50] Riordan, J.F. und Vallee, B.L.
Biochemistry 2, 1460-1468 (1963)

- [51] Riordan, J.F., Wacker, W.E.C. und Vallee, B.L.
Biochemistry 4, 1758-1765 (1965)
- [52] Komatsu, S.K. und Feeney, R.E.
Biochemistry 6, 1136-1141 (1967)
- [53] Barman, T.E. und Koshland, Jr., D.E.
J. Biol. Chem. 242, 5771-5776 (1967)
- [54] Spande, T.F., Wilchek, N. und Witkop, B.
J. Am. Chem. Soc. 90, 3256-3258 (1968)
- [55] Chan, T.L. und Schellenberg, K.A.
J. Biol. Chem. 243, 6284-6290 (1968)
- [56] Spande, T.F. und Witkop, B.
Methods Enzymol. 11, 498-506 (1967)
- [57] Funatsu, M., Green, N.M. und Witkop, B.
J. Am. Chem. Soc. 86, 1846-1848 (1964)
- [58] Spande, T.F. und Witkop, B.
Methods Enzym. 11, 528-532 (1967)
- [59] Sokolovsky, M., Riordan J.F. und Vallee, B.L.
Biochemistry 5, 3582-3589 (1966)
- [60] Hoare, D.G. und Koshland, Jr., D.E.
J. Biol. Chem. 242, 2447-2453 (1967)
- [61] Bray, G.A.
Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960)
- [62] Horinishi, H., Hachamori, Y., Kurihara, K. und
Shibata, K.
Biochim. Biophys. Acta 86, 477-489 (1964)
- [63] Sokolovsky, M. und Vallee, B.L.
Biochemistry 5, 3574-3581 (1966)
- [64] Mühlrad, A., Hegyi, G. und Toth, G.
Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.
2, 19-29 (1967)

- [65] Mùhlrad, A., Hegyi, G. und Horányi, M.
Biochim. Biophys. Acta 181, 184-190 (1969)
- [66] Sluyterman, L.A.AE.
Biochim. Biophys. Acta 139, 418-429 (1967)
- [67] Mahler, H.R. und Cordes, E.H.
Éiological Chemistry, 2nd ed., Harper & Row
Publ. New York/Evanston/San Francisco/ London (1971)
- [68] Zaheer, F. und Nicholson, B.H.
Biochim. Biophys. Acta 251, 38-43 (1971)
- [69] Howard, A.N. und Wild, F.
Biochem. J. 65, 651-659 (1957)
- [70] Higgins, H.G. und Harrington, K.J.
Arch. Biochim. Biophys. 85, 409-425 (1959)
- [71] Williams, J. und Lowe, J.M.
Biochem. J. 121, 203-209 (1971)
- [72] Nees, S., Schmidt, W. und Schneider, F.
Z. physiol. Chem. 352, 355-368 (1971)
- [73] Glazer, A.N.
Ann. Rev. Biochem. 39, 101-130 (1970)
- [74] Vincent, J.P., Lazdunski, M. und Delaage, M.
Eur. J. Biochem. 12, 250-257 (1970)
- [75] Beaven, G.H. und Gratzner, W.B.
Biochim. Biophys. Acta 168, 456-462 (1968)
- [76] Doyle, R.J., Bello, J., Roholt, O.A.
Biochim. Biophys. Acta 160, 274-276 (1968)
- [77] Boesel, R.W. und Carpenter, F.H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 678-682 (1970)
- [78] Takenaka, A., Susuki, T., Takenaka, O., Horinishi,
H. und Shibita, K.
Biochim. Biophys. Acta 194, 293-300 (1969)

- [79] Drèze, A.
Biochem. J. 62, 3 P. (1956)
- [80] Schröder, E. und Lübke, K.
in: The Peptides, Bd. 1, Academic Press, New-York, London (1965)
- [81] Sluyterman, L.A.AE. und De Graaf, M.J.M.
Biochim. Biophys. Acta 258, 554-561 (1971)
- [82] Gertler, A.
Eur. J. Biochem. 23, 36-40 (1971)
- [83] Harrington, W.F. und von Hippel, P.H.
in: Advances in Protein Chemistry (Anfinsen, Jr., C.B., Anson, M.L., Bailey, K., Edstall, J.T. Hrsg.)
Bd. 16, S. 1-127 (besonders S. 95-127) (1961)
- [84] Berger, A. und Schechter, I.
Phil.Trans.Roy. Soc. Lond. B 257, 249-264 (1970)
- [85] Polgár, L.
Eur. J. Biochem. 33, 104-109 (1973)
- [86] Wallenfels, K. und Eisele, B.
Eur. J. Biochem. 3, 267-275 (1968)
- [87] Bruice, T.C., Gregory, M.J. und Walters, S.L.
J. Am. Chem. Soc. 90, 1612-1619 (1968)
- [88] Myers, B. und Glazer, A.N.
J. Biol. Chem. 246, 412-419 (1971)
- [89] Kirschenbaum, D.M.
Biochim. Biophys. Acta 235, 159-163 (1971)
- [90] Morihara, K. und Nagami, K.
J. Biochem. (Tokyo) 65, 321-323 (1969)
- [91] Jori, G. und Galianzo, G.
Photochemistry und Photobiology 14, 607-619 (1971)

- [92] Mole, J.E. und Horton, H.
Biochemistry, 12, 5278-5285 (1973)
- [93] Mole, J.E. und Horton, H.
Biochemistry, 12, 5285-5289 (1973)
- [94] Sokolovsky, M., Harell, D. und Riordan, J.F.
Biochemistry 8, 4740-4745 (1969)
- [95] Sun, Y.K. und Tsou, C.L.
Sci. Sinica (Peking) 14, 749-754 (1965)
- [96] Perez-Villasenor, J. und Torre-Blanco, A.
Fed. Proc. 28, 887 (1969)
- [97] Sluyterman, L.A.AE. und De Graaf, M.J.M.
Biochim. Biophys. Acta 200, 595-597 (1970)
- [98] Shinitzky, M. und Goldmann, R.
Eur. J. Biochem. 3, 139-144 (1967)
- [99] Steiner, R.F.
Biochemistry 10, 771-778 (1971)
- [100] Löffler, H.G. und Schneider, F.
Z. Naturforsch. 27 b, 1490-1497 (1972)
- [101] Murachi, T. und Okumura, K.
FEBS Letters 40, 127-129 (1974)
- [102] Lewis, S.D. und Shafer, J.A.
Biochemistry 13, 690-697 (1974)
- [103] Viswanatha, T. und Lawson, W.B.
Arch. Biochem. Biophys. 93, 128-134 (1961)
- [104] Nakayama, H., Tanizawa, K. und Kanaoka, Y.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 537-541

Lebenslauf

Am 19. 11. 1942 wurde ich als erstes Kind des Ingenieurs Waldemar Löffler und seiner Frau Liselotte, geb. Brenzing, in Stuttgart geboren.

Von Herbst 1949 bis Frühjahr 1963 besuchte ich zuerst die Volksschule in Ebersbach/Fils und anschließend das Hohenstaufengymnasium Göppingen, wo ich auch das Abitur ablegte. Während der anschließenden Tätigkeit als Apotheken-Praktikant in Göppingen entschloß ich mich zum Studium der Biochemie, das ich dann zum Wintersemester 1963/64 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen begann.

1964 und 1967 legte ich die Vorprüfungen und 1969 die Diplomhauptprüfung ab. Von Dezember 1969 bis Juli 1970 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider an meiner Diplomarbeit über die SH-Protease Papain.

Die Untersuchungen an diesem Enzym wurden in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls unter Anleitung von Prof. Dr. Fr. Schneider, von November 1970 bis März 1974 am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg fortgesetzt.

